

**UNIVERSIDADE DE LISBOA
FACULDADE DE FARMÁCIA**



**CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE BIOLÓGICA DA
FRAMBOESA (*Rubus idaeus* L.). CONTRIBUIÇÃO PARA O
DESENVOLVIMENTO DE UMA ALEGAÇÃO DE SAÚDE**

Maria Madalena Morais Bettencourt da Câmara Correia

Orientadores: Prof^a Doutora Maria Eduardo Costa Morgado Figueira

Prof^a Doutora Maria do Rosário Beja Gonzaga Bronze

Tese especialmente elaborada para a obtenção do grau de Doutor em FARMÁCIA,
especialidade Bromatologia

2016

**UNIVERSIDADE DE LISBOA
FACULDADE DE FARMÁCIA**



**CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE BIOLÓGICA DA
FRAMBOESA (*Rubus idaeus* L.). CONTRIBUIÇÃO PARA O
DESENVOLVIMENTO DE UMA ALEGAÇÃO DE SAÚDE**

Maria Madalena Morais Bettencourt da Câmara Correia

Orientadores: Prof^ª Doutora Maria Eduardo Costa Morgado Figueira
Prof^ª Doutora Maria do Rosário Beja Gonzaga Bronze

Tese especialmente elaborada para a obtenção do grau de Doutor em FARMÁCIA,
especialidade Bromatologia

Júri:

Presidente: Prof^ª Doutora Matilde da Luz dos Santos Duque da Fonseca e Castro

Vogais:

- Prof. Doutor Fernando dos Ramos
- Prof. Doutor Bruno Miguel Nogueira Sepodes
- Prof^ª Doutora Maria Margarida Boavida Pontes Gonçalves
- Doutora Ana Teresa de Carvalho Negrão Serra
- Prof^ª Doutora Cristina Maria Martins Almeida
- Prof^ª Doutora Maria Eduardo Costa Morgado Figueira

2016

Aos meus pais

Ao meu amigo Fernando Vieira de Sá

AGRADECIMENTOS

Concluído o trabalho de doutoramento quero expressar o meu agradecimento a todos quantos contribuíram, direta e indiretamente, para a sua realização. Agradeço em particular:

Às minhas orientadoras Professora Doutora Maria Eduardo Figueira e Professora Doutora Maria do Rosário Bronze agradeço a orientação, as sugestões, correções e paciência.

À Egas Moniz, Cooperativa de Ensino Superior CRL., na pessoa do seu presidente Professor Doutor Martins dos Santos agradeço todo o apoio prestado, fundamental à concretização deste trabalho.

Ao INIAV, I.P. - Instituto Nacional de Investigação Agrária e Veterinária, em Oeiras, e em particular ao Doutor Pedro Brás de Oliveira, pela disponibilização das amostras de framboesa usadas neste trabalho.

Ao IBET pela oportunidade de realizar aí parte do trabalho desta tese e à equipa do IBET, nomeadamente ao Professor Doutor Vilas Boas, às colegas Dr.^a Elsa Mecha, Dr.^a Andreia Bento da Silva e Dr.^a Sandra Silva pelo apoio, amizade e acompanhamento nos ensaios da caracterização química e ao Dr. Antero Ramos pela amizade sempre demonstrada.

À equipa da Faculdade de Farmácia, nomeadamente aos Professores Doutores Bruno Sepodes e João Rocha e em particular à colega Dr.^a Rosa Direito pelo apoio inestimável na realização dos ensaios *in vivo*. À Professora Doutora Adelaide Fernandes pela realização dos ensaios histológicos e imunocitoquímicos.

À Professora Doutora Catarina Duarte, do Laboratório Nutracêuticos e Libertação Controlada do ITQB, e à sua equipa, pela realização dos ensaios químicos da atividade antioxidante.

Ao Dr. João Ferreira da Faculdade de Farmácia pela realização das análises HPLC-MS/MS; ao Doutor Rodrigo Feliciano e ao seu supervisor, Professor Doutor Jess Reed,

responsável pelo grupo de investigação Reed da Universidade de Wisconsin-Madison, Madison, US, e à Doutora Ana Varela Coelho da equipa *Plant Proteins* do ITQB, pela realização das análises MALDI-TOF.

A todos os meus colegas e amigos do ISCSEM, principalmente ao Professor Doutor Agostinho de Carvalho e às Doutoradas Madalena Oom, Paula Pereira e Margarida Moncada, pelo apoio, conselhos, disponibilidade e amizade ao longo da realização deste trabalho.

Aos meus amigos e familiares, pelo suporte incondicional e encorajamento nos momentos mais desafiantes.

RESUMO

As doenças crónicas, atualmente a principal causa de morte em todo o mundo, têm aumentado dramaticamente consequência das modificações de estilos de vida, nomeadamente sedentarismo, níveis elevados de stresse e alterações na dieta. Segundo a OMS estas mortes prematuras podem ser prevenidas. A promoção de hábitos alimentares saudáveis, tais como o aumento da ingestão de frutas e produtos hortícolas, a principal fonte de (poli)fenóis bioativos, constitui uma via para a proteção da saúde das populações.

A framboesa vermelha (*Rubus idaeus* L.) é um fruto de produção recente em Portugal. Este pequeno fruto vermelho constitui uma fonte dietética de compostos bioativos, incluindo compostos fenólicos, antocianinas e elagitaninos, que têm demonstrado atividades biológicas antioxidante, anti-inflamatória, antimicrobiana, antiproliferativa e anticancerígena, entre outras. Existem alguns estudos sobre os efeitos fisiológicos destes frutos mas poucos foram realizados em animais e humanos, e tendo isso em consideração o nosso estudo teve por objetivo a caracterização química e biológica de frutos de *Rubus idaeus* L. produzidos em território nacional visando dar um contributo para o desenvolvimento de uma alegação de saúde.

Assim, amostras de frutos de *Rubus idaeus* L. da região de Odemira, Alentejo Litoral, foram caracterizadas quimicamente: genótipos distintos, produzidos na zona de Odemira entre 2011 e 2013; um extrato de uma amostra de framboesas colhidas em 2010 que foi usado na avaliação da atividade biológica (capacidade antioxidante e anti-inflamatórias) *in vitro* e *in vivo* em modelos celulares e animais; uma amostra de framboesas maduras da cv. Amira ingeridas por voluntários saudáveis num estudo de intervenção nutricional (ENIH).

A caracterização fenólica foi realizada em extratos (metanol e acetona) por técnicas cromatográficas e de espetrometria de massa (HPLC-DAD e LC-DAD-MS/MS, MALDI-TOF-MS) e espectrofotométricas (fenóis totais, FT, flavonóides totais, FLT, antocianinas totais, AT, taninos hidrolisáveis totais, THT, e taninos condensados totais, TCT) e a capacidade antioxidante *in vitro* pelos métodos ORAC e HORAC. Como referido na bibliografia, as framboesas analisadas são abundantes em compostos fenólicos, sobretudo antocianinas e elagitaninos. A aplicação da espetrometria de massa MALDI-TOF possibilitou uma obtenção rápida de espetros, tendo sido identificados 33 compostos: antocianinas, sobretudo derivados da cianidina e da pelargonidina, sanguina H-6 e Lambertianina C, ácido elágico e derivados e derivados da quercetina, entre outros, e dos ácidos quínico e cítrico. As análises HPLC-ESI-MS/MS num equipamento do tipo triplo quadrupolo possibilitaram a identificação de maioria destes compostos e ainda de ácidos hidroxicinâmicos, de outros taninos hidrolisáveis e do ácido

málico. A quantificação das amostras foi realizada por HPLC-DAD. A comparação da composição fenólica de framboesas dos 4 genótipos possibilitou a escolha da Amira para os ensaios biológicos.

O extrato de *Rubus idaeus* L. selecionado mostrou atividade antioxidante elevada em testes *in vitro*, não só de avaliação de atividade antioxidante química, testes ORAC e HORAC, mas igualmente em ensaios que avaliam o mesmo efeito em meio celular como o CAC, feito em células Caco-2, e na modulação do *oxidative burst* dos neutrófilos.

O extrato [15 mg Fenóis Totais (EAG).Kg⁻¹] quando usado no modelo de inflamação aguda de edema induzido pela carragenina, em rato, mostrou ter um elevado efeito anti-inflamatório mas só quando foi administrado via intraperitoneal (i.p.). No modelo de inflamação crónica de artrite reumatoide (AR) induzida pelo colagénio II, o mesmo extrato administrado i.p. mas também por via oral (p.o.) mostrou ter uma potente atividade anti-inflamatória diminuindo o edema, os danos na cartilagem, o inchaço dos tecidos moles e a reabsorção óssea e reduzindo marcadamente a expressão de iNOS e de COX-2, demonstrando uma proteção significativa na progressão da AR.

No ENIH, pretendeu-se estudar o efeito do consumo de 150 g de framboesas, diariamente, durante 3 semanas, no stresse pós-prandial metabólico, oxidativo e inflamatório, induzido por uma refeição hipercalórica rica em gordura e açúcar (RRGA), em voluntários saudáveis. Os resultados mostraram que o consumo de framboesas evitou o decréscimo pronunciado dos níveis de HDL e, em parte, a oxidação das LDL provocados pela RRGA, diminuiu significativamente os valores basais de LDLox dos voluntários e atenuou o aumento de valor de TNF- α e de IL-6 provocados pela ingestão da mesma refeição.

Os nossos resultados sugerem que a framboesa e o seu extrato fenólico podem atenuar, em certa medida, o stresse metabólico, oxidativo e inflamatório e, como tal, ter um papel importante de proteção na saúde humana.

Visando dar um contributo para o desenvolvimento de uma alegação de saúde sobre framboesa ou extratos desta, ricos em compostos fenólicos, foram analisados e discutidos requisitos legais vigentes e orientações da Autoridade Europeia de Segurança dos Alimentos respeitantes à fundamentação científica de alegações de saúde na UE. Foram ainda identificadas as alegações de saúde autorizadas suscetíveis de serem usadas por frutos ou extratos de *Rubus idaeus* L.

Palavras-chave

Framboesa vermelha, compostos fenólicos, antocianinas, elagitaninos, atividade antioxidante, artrite reumatóide, stresse pós prandial, atividade anti-inflamatória, alegações de saúde

ABSTRACT

Chronic diseases, currently the leading cause of death around the world, have increased dramatically result of changes in lifestyle, including physical inactivity, high levels of stress and changes in diet. According to the WHO these premature deaths are preventable. The promotion of healthy eating habits, such as increased intake of fruit and vegetables, the main source of bioactive (poly)phenols, is a way to protect the health of populations.

The red raspberry fruit (*Rubus idaeus* L.) is a recent production in Portugal. This red fruit is a dietary source of bioactive compounds, including phenolic compounds, anthocyanins and ellagitannins, which have demonstrated biological activity, antioxidant, anti-inflammatory, antimicrobial, antiproliferative and anti-cancer, among others. There are some studies on the physiological effects of these fruits but few have been conducted in animals and humans. Taking this into consideration, our study aimed to achieve a chemical and biological characterization of *Rubus idaeus* L. fruits produced in our country in order to contribute to the development of a health claim.

Thus, some fruit samples of *Rubus idaeus* L. from Odemira area in the Alentejo Coast were characterized chemically: 4 genotypes, produced between 2010 and 2013; an extract produced from raspberries harvested in 2010 which was used in the evaluation of the biological activity (antioxidant activity and anti-inflammatory) *in vitro* and *in vivo* in cell and animal models; a sample of ripe Amira raspberries ingested by healthy volunteers in a study of nutritional intervention (ENIH).

The phenolic characterization was performed on extracts (methanol and acetone) by chromatographic and mass spectrometric techniques (HPLC-DAD and LC-DAD-MS/MS, MALDI-TOF-MS) and spectrophotometric (total phenols, FT, total flavonoids, FLT, anthocyanins, AT, total hydrolysable tannins, THT, and condensed tannins total, TCT) and *in vitro* antioxidant capacity by ORAC and HORAC methods. As mentioned in the literature, the raspberries analysed were abundant in phenolic compounds, especially anthocyanins and ellagitannins. The application of MALDI-TOF mass spectrometry has enabled a rapid spectra realization. 33 compounds were identified: anthocyanins, particularly derivatives of cyanidin and pelargonidin, sanguinaria H-6 and lambertianina C, ellagic acid and derivatives and derivatives of quercetin, among others, and quinic acid and citric acid. HPLC-ESI-MS/MS analyses on a triple quadrupole equipment allowed the identification of most of those

compounds and the further identification of one hydroxycinnamic acid, other hydrolyzable tannins and malic acid. The quantification of the samples was carried out by HPLC-DAD.

Phenolic composition comparison of the 4 raspberries genotypes allowed the choice of Amira for biological assays.

The selected *Rubus idaeus* L. extract showed a high antioxidant activity *in vitro* tests, not only regarding the chemical antioxidant activity, HORAC ORAC tests, but also in assays that evaluate the same effect on a cellular environment as the CAC, realized in Caco-2 cells, and in the neutrophils oxidative burst modulation.

The extract [15 mg of Total Phenols (GAE).Kg⁻¹], when used in the acute inflammatory model of carrageenin-induced edema in rat, was shown to have a high anti-inflammatory effect but only when it was administered i.p. In the chronic inflammation rheumatoid arthritis (RA) model induced by collagen II, the same extract administered i.p. but also orally (p.o.) showed a potent anti-inflammatory activity, decreasing the edema, cartilage damage, soft tissue swelling and bone resorption, and markedly reducing the expression of iNOS and COX2, demonstrating a significant protection in the progression of RA.

In ENIH it was intended to study the effect of the daily consumption of 150 g raspberries, for 3 weeks, on postprandial metabolic, oxidative and inflammatory stress, induced by a hypercaloric meal rich in fat and sugar (RRGA) in healthy volunteers. The results showed that consumption of raspberries avoided pronounced decrease in HDL levels and, in part, the LDL oxidation induced by RRGA significantly decreased the oxLDL volunteers baseline and attenuated the increase in TNF- α and IL-6 values caused by the ingestion of that meal.

Our results suggest that phenol and its raspberry extract can mitigate to some extent the metabolic, oxidative and inflammatory stress and, as such, could play an important role in human health protection.

Aiming to contribute to the development of a health claim on raspberry fruits or on their extracts rich in phenolic compounds, legal requirements and EFSA guidelines concerning the scientific basis of health claims on foods in the EU were analyzed and discussed. There were also identified the authorized health claims likely to be used on *Rubus idaeus* L. fruits or extracts.

Keywords

Red raspberry, phenolic compounds, anthocyanins, ellagitannins, antioxidant activity, rheumatoid arthritis, postprandial stress, anti-inflammatory activity, health claims

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

AAPH	di-hidrocloreto de 2,2'-azinobis-(metilpropionamidina)
ABTS	2,2'-azinobis-(3-etilbenzotiazolina-6-sulfonato)
ABTS^{•+}	radical catião ABTS
ALT	Alanina-amino transferase
ALP	Fosfatase alcalina, do inglês <i>alkaline phosphatase</i>
AR	Artrite Reumatóide
AS	Alegação de saúde
AS DSC	Alegações de saúde respeitantes à saúde e ao desenvolvimento das crianças
AS FGN	Novas alegações de saúde funcionais
AS RRD	Alegações de saúde relativas à redução de um risco de doença
ASP	Aspartato-aminotransferase
AT	Antocianinas totais
CII	Colagénio tipo II bovino
CAC	Capacidade Antioxidante Celular
Caco-2	Células de carcinoma do cólon humano
CAEAC	Capacidade antioxidante, equivalentes de ácido cafeico, do inglês <i>caffeic acid equivalents antioxidant capacity</i>
CAET	Capacidade antioxidante equivalente de Trolox
CAO	Capacidade antioxidante
CAT	Capacidade antioxidante total do plasma
CFA	Adjuvante completo de Freund, do inglês <i>complete Freund's adjuvant</i>
CIA	Artrite reumatóide induzida pelo colagénio
COX	Cicloxigenase
CRE	Creatinina
Cy-PG	Prostaglandina(s) ciclopentonoênica(s)
DAD	Detector de díodos
DS	Modo <i>Daughter Scan</i>
EAG	Equivalentes de ácido gálgico
EAE	Equivalentes de ácido elágico
EAT	Equivalentes de ácido tânico
EC	Equivalentes de catequina

EC3G	Equivalentes de cianidina-3-glucósido
ED	Detector eletroquímico, do inglês <i>electrochemical detector</i>
EFSA	Autoridade Europeia de Segurança dos Alimentos, em inglês <i>European Food Safety Authority</i>
ELISA	Método imunoenzimático, do inglês <i>Enzyme-linked Immunosorbent Assay</i>
ENIH	Estudo nutricional de intervenção em humanos
EQ	Equivalente de quercetina
ESI	Ionização por <i>electrospray</i> , do inglês <i>Electrospray ionisation</i>
ET	Equivalentes de Trolox
ETs	Elagitaninos
FF	Fruto fresco
FLT	Teor em flavonóides totais
FRAP	Poder antioxidante de redução do ferro, do inglês <i>Fer Reduction Antioxidant Power method</i>
FT	Teor em fenóis totais
GSH	Glutationa redutase
GPx	Glutationa-peroxidase
H	Hidrofílico
HDL	Lipoproteína de alta densidade, do inglês <i>high density lipoproteins</i>
H₂O₂	Peróxido de hidrogénio
HHDP	Grupo hexahidroxidifenol
HORAC	Capacidade de resgate do radical hidroxilo
HOCL	Ácido hipocloroso
HPLC	Cromatografia Líquida de Alta Pressão, do inglês <i>High Pressure Liquid Cromathography</i>
5-HT	5-hidroxipuptamina
ICAM 1	Molécula 1 de adesão intracelular
IL	Interleucina
iNOS	Óxido nítrico sintetase induzível
i.o.	Administração oral
i.p.	Administração intraperitoneal
L	Lipofílico
LC	Cromatografia em fase líquida de alta eficiência
LD	Limite de deteção
LDL	Lipoproteína de baixa densidade, do inglês <i>Low density lipoproteins</i>

LDL_{ox}	Lipoproteína de baixa densidade oxidada
LOO•	Radical alquilo peroxilo
LOS	Lipoxigenase
LPS	Lipopolissacárido
LQ	Limite de quantificação
LT	Leucotrieno(s)
LX	Lipoxina(s)
MAPK	Proteínas ativadoras de mitose cinase
MALDI	Ionização por dessorção a laser assistida por matriz, do inglês <i>Matrix-assisted laser desorption/ionization</i>
MCP-1	Proteína-1 quimioatratante de monócitos
MIPIα	Molécula 1 α macrófago inflamatória
<i>m/z</i>	Relação massa/carga
MM	Massa molecular
MS	Espectrometria de massa
NADH	Dinucleótido de nicotinamida e adenina, do inglês <i>Nicotinamide adenine dinucleotide</i>
NCDs	Doenças não transmissíveis, do inglês <i>Non communicable diseases</i>
NF-κB	Fator nuclear kappa B
NO	Óxido nítrico
NO•	Monóxido de azoto
NOD	recetor de domínio de oligomerização de ligação de nucleótidos, do inglês <i>nucleotide oligomerization domain</i>
$^1\text{O}_2$	Singuleto de oxigénio
O_2^-	Anião superóxido
O_3	Ozono
OH•	Radical hidroxilo
ONOO•	Ião peroxinítrico
ORAC	Capacidade Antioxidante do Radical Oxigénio, do inglês <i>Oxygen Radical Antioxidant Capacity</i>
PACs	Proantocianidinas
PCR-RT	Transcrição reversa seguida da reação de polimerização em cadeia, em tempo real
PDA	Detector de fotodíodos
PG	Prostaglandina(s)

QqQ	Analizador do tipo Triplo Quadrupolo, do inglês <i>Triple Quadrupole Mass Detector</i>
RCT	Estudos de intervenção em humanos, aleatórios controlados, do inglês <i>randomized controlled trials</i>
RI	Índice de refração, do inglês <i>refractive index</i>
RNS	Espécies reativas de azoto, do inglês <i>reactive nitrogen species</i>
RRGA	Refeição rica em gordura e açúcar
ROO[•]	Radical peroxilo
ROS	Espécies reativas de oxigénio, do inglês <i>reactive species of oxygen</i>
RS	Espécies reativas, do inglês <i>reactive species</i>
SIR	Registo de ião simples, do inglês <i>ion recording</i>
SOD	Superóxido dismutase
TCT	Teor em taninos condensados totais
TNF-α	Fator de necrose tumoral α , do inglês <i>tumoral necrose factor α</i>
THT	Teor em taninos hidrolisáveis totais
TIC	Corrente iónica total, do inglês <i>total ion current</i>
T_r ou t_r	Tempo de retenção
TOF	espectrómetro de massa tempo de voo, do inglês <i>time-of-flight mass spectrometer</i>
Trolox	Ácido 6-hidróxi-2,5,7,8-tetrametilcromano-2-carboxílico
TX	Tromboxanos
UV-vis	Ultravioleta-visível
VACM 1	Molécula 1 de adesão vascular
VLDL	Lipoproteína de muito baixa densidade, do inglês <i>Very low density lipoprotein</i>

ÍNDICE

AGRADECIMENTOS	i
RESUMO	iii
ABSTRACT	v
LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS	vii
ÍNDICE	xi
ÍNDICE DE TABELAS	xv
ÍNDICE DE FIGURAS	xix
INTRODUÇÃO	1
1. NUTRIENTES E NÃO NUTRIENTES PRESENTES NA FRAMBOESA	2
1.1 Caracterização nutricional	2
1.2 Componentes químicos presentes na framboesa	4
1.3 Compostos fenólicos presentes na framboesa	5
1.4. Metodologias de preparação de amostra e análise de compostos fenólicos	11
2. ATIVIDADE BIOLÓGICA	16
2.1 Atividade antioxidante	19
2.2 Atividade anti-inflamatória	23
3. BIODISPONIBILIDADE E METABOLISMO DE COMPOSTOS FENÓLICOS BIOATIVOS	56
4. ALEGAÇÕES DE SAÚDE SOBRE ALIMENTOS NA UE	59
5. OBJETIVOS E DELINEAMENTO EXPERIMENTAL	64
Capítulo I. CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DA FRAMBOESA (<i>Rubus idaeus</i> L.)	70
1. MATERIAL E MÉTODOS	70
1.1 Reagentes e Padrões	70
1.2 Amostras	72
1.3 Preparação dos Extratos de <i>Rubus idaeus</i> L.	74
1.4 Equipamentos	74
1.5 Métodos	76
1.5.1 Determinação do Extrato Seco e Cálculo da Humidade	76
1.5.2 Determinação do Teor em Vitamina C	76
1.5.3 Determinação do Teor em Fenóis Totais	77
1.5.4 Determinação do Teor em Flavonóides Totais	78
1.5.5 Determinação do Teor em Antocianinas Totais	79
1.5.6 Determinação do Teor em Taninos Hidrolisáveis Totais	80
1.5.7 Análise do Teor em Taninos Condensados Totais	80
1.5.8 Estudo da Composição Fenólica por HPLC	81
1.5.8.1 HPLC-DAD-ED	81
1.5.8.2 HPLC-DAD-MS/MS	83
1.5.8.3 MALDI-TOF-MS	84
1.5.9 Avaliação da Capacidade de Absorção do Radical Oxigénio (ORAC)	86
1.5.10 Avaliação da Capacidade de Resgate do Radical Hidroxilo (HORAC)	87

1.6 Tratamento dos Resultados	88
2. RESULTADOS E DISCUSSÃO	91
2.1 Otimização do Método para Preparação de Extratos	91
2.2 Escolha do Método de Conservação de Amostras de framboesa	94
2.3 Identificação de compostos fenólicos num Extrato de <i>Rubus idaeus</i> L. por Espectrometria de Massa	95
2.3.1 Análise em equipamentos do tipo MALDI-TOF	96
2.3.2 Análise por HPLC-MS/MS num equipamento do tipo triplo quadrupolo	105
2.4 Estudo da composição fenólica de amostras de framboesa no ano 2011 e evolução da composição ao longo do tempo de colheita	112
2.4.1 Estudo da composição fenólica de amostras de diferentes cultivares no ano 2011	112
2.4.2 Estudo da evolução da composição fenólica de amostras de diferentes cultivares ao longo do tempo de colheita	117
2.5 Estudo da evolução da composição fenólica de amostras de cultivares de framboesa de 2011-2013	119
2.6 Estudo da composição fenólica e da atividade antioxidante in vitro da amostra de framboesa usada em testes in vitro e em modelos animais	123
2.7 Estudo da composição fenólica da amostra de framboesa usada no estudo de intervenção em humanos	125
2.8 Resumo dos resultados obtidos para os diferentes extratos	128
Capítulo II. AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE BIOLÓGICA DA FRAMBOESA (<i>Rubus idaeus</i> L.)	138
1. ATIVIDADE ANTIOXIDANTE	139
1.1 Material e Métodos	139
1.1.1 Reagentes e Padrões	139
1.1.2 Amostras	139
1.1.3 Equipamentos	140
1.1.4 Métodos	140
1.1.4.1 Avaliação da Capacidade Antioxidante Celular	140
1.1.4.2 Avaliação do <i>Oxidative burst</i> pelos Neutrófilos	141
1.1.5 Tratamento dos Resultados	142
1.2 Resultados e Discussão	142
1.2.1 Estudo da Capacidade Antioxidante Celular	142
1.2.2 Avaliação do <i>Oxidative burst</i> pelos Neutrófilos	144
2. ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA EM MODELOS ANIMAIS	146
2.1 Material e Métodos	146
2.1.1 Reagentes e padrões	146
2.1.2 Amostras	147
2.1.3 Equipamento	147
2.1.4 Métodos	147
2.1.4.1 Estudo da atividade anti-inflamatória aguda <i>in vivo</i> num modelo animal	147
2.1.4.2 Estudo do efeito anti-inflamatório crónico num modelo animal de artrite reumatóide	150
2.1.5 Tratamento dos Resultados	156
2.2 Resultados e Discussão	156

2.2.1 Estudo da Atividade Anti-inflamatória Aguda no Modelo da Carragenina	156
2.2.2 Estudo da Atividade Anti-inflamatória Crônica num Modelo Animal da Artrite Reumatóide	159
3. ESTUDO DO IMPACTO DA INGESTÃO DE FRUTOS DE <i>RUBUS IDAEUS</i> L., POR VOLUNTÁRIOS SAUDÁVEIS, NO STRESSE OXIDATIVO, METABÓLICO E INFLAMATÓRIO PÓS PRANDIAL, PROVADO PELO CONSUMO DE UMA REFEIÇÃO HIPERCALÓRICA, RICA EM AÇÚCAR E GORDURA	166
3.1 Material e Métodos	166
3.1.1 Reagentes e padrões	166
3.1.2 Amostras	167
3.1.3 Equipamentos	167
3.1.4 Métodos	167
3.1.4.1 Ensaio de intervenção nutricional em humanos	167
3.1.4.2 Métodos de determinação dos biomarcadores	172
3.1.5 Tratamento dos Resultados	179
3.2 Resultados e Discussão	179
3.2.1 Glicémia	180
3.2.2 Triglicéridos	181
3.2.3 Colesterol, LDL e HDL	182
3.2.4 LDL oxidada	186
3.2.5 Capacidade Antioxidante Total do Plasma	187
3.2.6 TNF- α , IL-1 e IL-6	190
3.2.7 Marcadores das funções hepática, pancreática e renal	192
Capítulo III. ALEGAÇÕES DE SAÚDE SOBRE FRAMBOESAS (<i>RUBUS IDAEUS</i> L.)	195
1. METODOLOGIA	195
2. RESULTADOS E DISCUSSÃO	196
2.1 Alegações de Saúde sobre alimentos: elaboração do pedido de autorização e Fundamentação Científica	196
2.1.1 Elaboração do Pedido de autorização	196
2.1.2 Fundamentação científica	198
2.2 Requisitos científicos para alegações de saúde relativas a efeitos antioxidantes e anti-inflamatórios	201
2.3 Alegações de Saúde suscetíveis de serem usadas por frutos de <i>Rubus idaeus</i> L.	203
CAPÍTULO IV. CONCLUSÕES E CONSIDERAÇÕES FINAIS	205
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	210
APÊNDICES E ANEXOS	232
APÊNDICE A - PROCEDIMENTOS DE OBTENÇÃO DOS EXTRATOS DE <i>RUBUS IDAEUS</i> L.	233
APÊNDICE B - CARACTERIZAÇÃO DE FRUTOS DE <i>RUBUS IDAEUS</i> L. DE QUATRO GENÓTIPOS EM TRÊS OUTONOS CONSECUTIVOS (2011/2013)	234
APÊNDICE C - Alegações de Saúde suscetíveis de serem usadas por frutos de <i>Rubus idaeus</i> L. na UE	236
ANEXO A - PARÂMETROS DE CALIBRAÇÃO USADOS NA QUANTIFICAÇÃO DE COMPOSTOS SEPARADOS POR HPLC	237
ANEXO B – ENIH: QUESTIONÁRIO MÉDICO	238
ANEXO C - ENIH: FORMULÁRIO DO CONSENTIMENTO INFORMADO DO PARTICIPANTE	239
ANEXO D - ENIH: INSTRUÇÕES PARA OS PARTICIPANTES	240

ÍNDICE DE TABELAS

INTRODUÇÃO

Tabela 1.1	Pág. 4	Parâmetros utilizados na avaliação da qualidade de frutos frescos de <i>Rubus idaeus</i> L.
Tabela 1.2	Pág. 5	Teores totais em fenóis, flavonóides e antocianinas de frutos de <i>Rubus idaeus</i> L.
Tabela 1.3	Pág. 6	Composição fenólica de framboesas vermelhas frescas (<i>Rubus idaeus</i> L.)
Tabela 1.4	Pág. 12	Análise e quantificação de compostos fenólicos em extratos de <i>Rubus idaeus</i> L.: métodos adotados na bibliografia analisada
Tabela 1.5	Pág. 17	Potenciais efeitos biológicos benéficos da ingestão de <i>Rubus idaeus</i> L. na saúde: aspetos relevantes de estudos publicados e citados na Pubmed entre 1999 e 2010.
Tabela 1.6	Pág. 18	Potenciais efeitos biológicos benéficos da ingestão de <i>Rubus idaeus</i> L. na saúde: aspetos relevantes de estudos publicados e citados na Pubmed entre 2011 e 2015.
Tabela 1.7	Pág. 20	Avaliação da capacidade antioxidante potencial de frutos de <i>Rubus idaeus</i> L.
Tabela 1.8	Pág. 34	Efeitos pró-inflamatórios da PGE ₂ e de leucotrienos da série 4 (LTA ₄ , LTC ₄ , LTD ₄ , LTE ₄).
Tabela 1.9	Pág. 34	Efeitos anti-inflamatórios da PGE ₂ , das lipoxinas e das prostaglandinas ciclopentonoênicas
Tabela 1.10	Pág. 37	Principais famílias de citocinas.
Tabela 1.11	Pág. 38	Algumas características de citocinas relevantes na inflamação aguda e crónica.
Tabela 1.12	Pág. 49	Atividade anti-inflamatória de frutos/extratos de <i>Rubus idaeus</i> L.: estudos publicados entre 2001 e 2015.
Tabela 1.13	Pág. 62	Implementação do Regulamento (CE) N° 1924/2006; principais requisitos a considerar no desenvolvimento de alegações de saúde sobre alimentos.

CAPÍTULO I

Tabela I.1	Pág. 73	Identificação das amostras de frutos frescos de <i>Rubus idaeus</i> L. usadas nos estudos realizados no âmbito da tese.
Tabela I.2	Pág. 82	Programa de eluentes usado na análise do perfil fenólico por HPLC-DAD-ED.
Tabela I.3	Pág. 83	Programa de eluentes usado na análise dos compostos fenólicos por LC-DAD-MS/MS.
Tabela I.4	Pág. 84	Condições operacionais da fonte ESI no espectrómetro de massa.
Tabela I.5	Pág. 89	Análise HPLC-DAD: composição das misturas de padrões puros.
Tabela I.6	Pág. 93	Teores em fenóis e flavonóides totais (média ± DP) presentes

		nos extratos metanol: água:ácido fórmico (79,9:20:0,1 v/v/v) e metanol:acetona (50:50 v/v) de frutos de <i>Rubus idaeus</i> L. e dados da bibliografia.
Tabela I.7	Pág. 94	Teores em humidade, fenóis totais e flavonóides totais (média \pm DP) em extratos metanol: água: ácido fórmico (79,9:20:0,1 v/v/v), obtidos a partir de frutos <i>Rubus idaeus</i> L. conservados em diferentes condições.
Tabela I.8	Pág. 100	Análise de um extrato de framboesa por MALDI-TOF nos modos refletão negativo (A) e positivo (B): iões precursores, iões produto, tentativa de identificação.
Tabela I.9	Pág. 107	Tentativa de identificação dos principais compostos do extrato metanol: água: ác. fórmico (79,9:20;0,1 v/v/v) de frutos da cv. Himbo-top (2013) por LC-DAD-MS/MS efetuados em modo positivo (+) e negativo (-).
Tabela I.10	Pág. 113	Composição fenólica de framboesas de quatro cultivares produzidas no Outono de 2011 (média de pelo menos 3 replicados \pm DP).
Tabela I.11	Pág. 118	Coeficientes de variação (%) de teores em compostos fenólicos e flavonóides de frutos de <i>Rubus idaeus</i> L. produzidos no Outono de 2011.
Tabela I.12	Pág. 120	Composição fenólica média de frutos de quatro genótipos de <i>Rubus idaeus</i> L. nos anos 2011 a 2013 ¹ .
Tabela I.13	Pág. 120	Dados bibliográficos da composição fenólica de genótipos de <i>Rubus idaeus</i> L.
Tabela I.14	Pág. 120	Composição fenólica média de frutos de <i>Rubus idaeus</i> L. nos anos 2011- 2013 ¹ .
Tabela I.15	Pág. 122	Teor médio dos principais compostos fenólicos presentes em framboesas nacionais de quatro genótipos dos Outonos 2011/2013 (A), noutros genótipos (B) e em framboesas nacionais produzidas nos Outono de 2011, 2012 e 2012 (C) (n= 36); (todos os dados foram expressos por 100 g FF) ² .
Tabela I.16	Pág. 124	Teores em ácido ascórbico e composição fenólica de frutos de <i>Rubus idaeus</i> L. e do extrato metanol:acetona (50:50 v/v). (n=3, média \pm DP).
Tabela I.17	Pág. 124	Atividade antioxidante <i>in vitro</i> do extrato metanol:acetona (50:50, v/v). (n=3, Média \pm DP).
Tabela I.18	Pág. 126	Teores em ácido ascórbico e composição fenólica de frutos de <i>Rubus idaeus</i> L. produzidos da cv. Amira (ENIH) e do respetivo extrato (n=3; média \pm DP).
Tabela I.19	Pág. 127	Atividade antioxidante <i>in vitro</i> de framboesas da cv. Amira usadas no ensaio de intervenção em humanos (n=3, média \pm DP).
Tabela I.20	Pág. 129	Resumo dos dados do teor em ácido ascórbico e da caracterização fenólica de extratos de <i>Rubus idaeus</i> L.

CAPÍTULO II

Tabela II.1	Pág. 143	Avaliação da atividade antioxidante celular <i>in vitro ex vivo</i> de um extrato metanol:acetona (50:50, v/v) de frutos frescos de <i>Rubus idaeus</i> L.
--------------------	----------	--

Tabela II.2	Pág. 150	Protocolo experimental do estudo da atividade anti-inflamatória aguda do extrato de <i>Rubus idaeus</i> L.
Tabela II.3	Pág. 150	Protocolo experimental do estudo do efeito anti-inflamatório de um extrato de framboesa num modelo de artrite induzida pelo colagénio do tipo II.
Tabela II.4	Pág. 164	Efeito do modelo de artrite reumatóide e da administração de extrato de framboesa nos marcadores bioquímicos de lesão: Alanina Aminotransferase (ALT), Aspartato Aminotransferase (AST), Creatina Cinase (CK), Ureia e Creatinina.
Tabela II.5	Pág. 170	Composição da refeição rica em gordura e açúcar.
Tabela II.6	Pág. 180	Valores de Glicémia, avaliada em jejum e após o consumo de RRGa, antes e após a intervenção nutricional em voluntários adultos saudáveis.
Tabela II.7	Pág. 181	Valores de Triglicéridos, avaliados em jejum e após o consumo de RRGa, antes e após a intervenção nutricional em voluntários adultos saudáveis.
Tabela II.8	Pág. 182	Valores de Colesterol, LDL e HDL, avaliados em jejum e após o consumo de um pequeno-almoço hipercalórico, antes e após a intervenção nutricional em voluntários adultos saudáveis.
Tabela II.9	Pág. 185	Valores de LDLox, avaliados em jejum e após o consumo de RRGa, antes e após a intervenção nutricional em voluntários adultos saudáveis.
Tabela II.10	Pág. 187	Capacidade antioxidante total do plasma (CAT), avaliada em jejum e após o consumo de um pequeno-almoço hipercalórico, antes e após a intervenção nutricional em voluntários adultos saudáveis.
Tabela II.11	Pág. 190	Teores das citocinas pró-inflamatórias IL-1 β , IL-6 e TNF- α , avaliada em jejum e após o consumo de um pequeno-almoço hipercalórico, antes e após a intervenção nutricional em voluntários adultos saudáveis.
Tabela II.12	Pág. 192	Biomarcadores relativos à monitorização das funções hepática, pancreática e renal, antes e após a intervenção nutricional em voluntários adultos saudáveis.

CAPÍTULO III

Tabela III.1	Pág. 197	Legislação e documentos orientadores relevantes no desenvolvimento de uma alegação de saúde sobre alimentos.
Tabela III.2	Pág. 198	Etapas e aspetos fundamentais a considerar na preparação de um pedido de autorização para uso de uma alegação de saúde sobre alimentos na UE.
Tabela III.3	Pág. 199	Fundamentação científica das alegações de saúde sobre alimentos. Critérios e processo de avaliação do suporte científico dos pedidos de autorização de alegações de saúde.
Tabela III.4	Pág. 200	Argumentos científicos da EFSA respeitantes a pedidos de AS não fundamentados.

APÊNDICES E ANEXOS

Tabela 1	Pág. 234	Aspetos da Composição Fenólica Global Média de Frutos de <i>Rubus idaeus</i> L. colhidos nos Outono de 2011, 2012 e 2013.
Tabela 2	Pág. 235	Teor médio dos principais compostos fenólicos presentes framboesas produzidas nos Outono de 2011, 2012 e 2013 ² .
Tabela 3	Pág. 236	Parâmetros de calibração usados na quantificação dos compostos fenólicos separados por HPLC-DAD-ED.
Tabela 4	Pág. 237	Alegações nutricionais aplicáveis a framboesas frescas.
Tabela 5	Pág. 237	Alegações de saúde do Art.13.1 para um consumo de 100 g de framboesas frescas.

ÍNDICE DE FIGURAS

INTRODUÇÃO

Figura 1.1	Pág. 3	Aspetos de características nutricionais de framboesas europeias ^I e norte-americanas ^{II}
Figura 1.2	Pág.15	Esquema da análise num sistema de HPLC acoplado a um espectrómetro de massa do tipo triplo quadrupolo; equipamento MALDI-TOF-MS.
Figura 1.3	Pág.16	Bioatividade de frutos de <i>Rubus idaeus</i> L.: estudos publicados na Pubmed entre 1999 e 2015 (Novembro).
Figura 1.4	Pág. 27	Cascata de adesão dos leucócitos para os tecidos.
Figura 1.5	Pág. 31	Mediadores pró-inflamatórios e inflamatórios que intervêm nas respostas inflamatórias agudas e crónicas.
Figura 1.6	Pág. 35	Esquema da via de síntese dos eicosanóides a partir do ácido araquidónico.
Figura 1.7	Pág. 39	Stresse oxidativo e inflamação.
Figura 1.8	Pág. 45	Representação esquemática de uma articulação normal e artrítica.
Figura 1.9	Pág. 53	Representação esquemática da interrelação dos efeitos antioxidante e anti-inflamatório potencial de (poli)fenóis na dieta.
Figura 1.10	Pág. 58	Metabolismo dos elagitaninos e ácido elágico.
Figura 1.11	Pág. 60	Representação esquemática dos tipos fundamentais de alegações de saúde disponíveis no Regulamento (CE) N° 1924/2006.

CAPÍTULO I

Figura I.1	Pág. 73	Framboesas das cultivares Himbo-top (A), Amira (B), Erika (C) e Polka (D)
Figura I.2	Pág. 85	Aspeto do MALDI-TOF/TOF ABSciex (Applied Biosystems), modelo 4800, do ITQB.
Figura I.3 A	Pág. 98	Espetros de massa obtidos em modo refletor negativo na gama de m/z 100 - 2000
Figura I.3 B	Pág. 99	Espetros de massa obtidos em modo refletor positivo na gama de m/z 100 - 2000
Figura I.4	Pág. 104	Espetros MALDI-TOF-ICR MS (A, B e C) do extrato metanólico aquoso, acidificado com ác. fórmico (79,9:20:0,1 v/v/v) de framboesas da cv. Amira usada no ENIH.
Figura I.5	Pág. 115	Cromatograma tipo de uma amostra de extrato de framboesa analisada por (A) DAD a 520 nm, (B) DAD a 280 nm, (C) MS (modo Full SCAN positivo), (D) MS (modo Full SCAN negativo).
Figura I.6	Pág. 108	Cromatogramas de massa de antocianinas do extrato de framboesas da cv. Himbo-top 2013 (modo MS Scan ESI ⁺).
Figura I.7	Pág. 108	Cromatogramas de massa de antocianinas do extrato de framboesas da cv. Amira 2013 (modo MS Scan ESI ⁺).

Figura I.8	Pág. 109	(A) Espectro de massa identificado como cianidina-3-glucósido; (B) Espectro MS/MS do ião precursor (m/z 449).
Figura I.9	Pág. 111	Análise HPLC-DAD-ED. Sobreposição dos cromatogramas HPLC-DAD ao c.d.o 280 nm e HPLC-ED do extrato de metanol:acetona (50:50 v/v) de framboesa.
Figura I.10	Pág. 115	Comparação dos perfis cromatográficos dos extratos metanol:água: ácido fórmico (79,9:20:0,1 v/v/v) de framboesas das cultivares Himbo-top (A), Amira (B), Erika (C) e Polka (D), diluídos (1:2,5), ao c.d.o. 520 nm.
Figura I.11	Pág. 115	Composição e conteúdo em antocianinas totais (AT) dos extratos metanol:água:ácido fórmico (79,9:20:0,1 v/v/v) de framboesas de quatro cultivares, produzidas no Outono de 2011, separadas por HPLC-DAD ao c.d.o. 520 nm.
Figura I.12	Pág. 117	Evolução do conteúdo em fenóis totais (A) e flavonóides totais (B) de frutos das 4 cultivares de <i>Rubus idaeus</i> L. em 2011.
Figura I.13	Pág. 121	Comparação dos perfis cromatográficos amostra da cv. Amira nos anos 2011, 2012 e 2013, a 280 nm (em cima) e 520 nm (em baixo).
Figura I.14	Pág. 127	Composição fenólica de extratos metanol:água:ácido fórmico (79,9:20:0,1 v/v/v) framboesas da cv. Amira usadas no ensaio de intervenção nutricional em humanos (EINH) e de framboesas colhidas em Dezembro de 2012 (cv. Amira) (média ± DP).

CAPÍTULO II

Figura II.1	Pág. 145	Efeito inibitório de um extrato de <i>Rubus idaeus</i> L. na oxidative burst em neutrófilos humanos.
Figura II.2	Pág. 149	Avaliação do volume da pata no pletismómetro.
Figura II.3	Pág. 157	Efeitos do extrato de framboesa vermelha (i.p. e p.o.) no aumento do volume da pata induzido pela carragenina.
Figura II.4	Pág. 159	Efeitos do extrato de frutos de framboesa vermelha (i.p. e p.o.) no aumento do volume da pata associado à CIA.
Figura II.5	Pág. 159	Efeito do tratamento com extrato de framboesa (i.p. e p.o.) na pontuação dos danos histológicos (A) e na pontuação radiológica (B) em animais com artrite induzida pelo colagénio (AR).
Figura II.6	Pág. 160	Cortes histopatológicos (A) e ampliações dos mesmos (B) relativos aos efeitos do extrato de framboesa vermelha num modelo animal de CIA, em ratos.
Figura II.7	Pág. 160	Progressão radiográfica da CIA nas articulações tibiotársicas.
Figura II.8	Pág. 161	Redução da ativação COX-2 no modelo CIA resultado da administração do extrato de framboesa vermelha.
Figura II.9	Pág. 161	Redução da ativação iNOS no modelo CIA resultado da administração do extrato de framboesa vermelha.
Figura II.10	Pág. 169	Diagrama de fluxo do estudo de intervenção nutricional em voluntários saudáveis.

APÊNDICES E ANEXOS

Figura 1	Pág. 234	Esquema dos procedimentos de obtenção dos extratos de <i>Rubus idaeus</i> L.: extrato acidificado de metanol e água (A) e extrato concentrado em água Milli-Q [®] de metanol e acetona (B).
-----------------	----------	--

Introdução

INTRODUÇÃO

Existe um consenso geral a nível científico de que a ingestão regular de frutos e produtos hortícolas e seus derivados, sobretudo frescos ou minimamente processados, tem um impacto positivo na saúde humana¹⁻⁴. A par de nutrientes, os alimentos veiculam metabolitos secundários das plantas, não-nutrientes (fitoquímicos), nomeadamente compostos fenólicos, considerados, em certa medida, os responsáveis por alguns benefícios para a saúde^{5,6}. Ao contrário das vitaminas, estas substâncias não são essenciais ao ser humano^{3,4,7}. Os fitoquímicos dietéticos ingeridos são abordados pelo organismo humano como xenobióticos, metabolizados e prontamente eliminados³. No entanto, aportes modestos destes fitoquímicos por longos períodos de tempo, como os proporcionados pelo consumo regular e em quantidade significativa dos produtos acima referidos, poderão, ter efeitos fisiológicos benéficos para a saúde humana^{3,4,7,8}. O impacto favorável dos fitoquímicos na saúde humana atribuiu-se sobretudo à atividade antioxidante que exibem *in vitro* e ao pressuposto que a mesma se verifica *in vivo*^{3,4,9-13}.

Os frutos de baga integram a dieta humana desde o Neolítico. Framboesas vermelhas e pretas (*Rubus idaeus* L. e *Rubus occidentalis* L.), groselhas vermelhas e pretas (*Ribes rubrum* L. e *Ribes nigrum* L.), morangos (*Fragaria ananassa* L.), amoras (*Rubus fruticosus* L.) e mirtilos (*Vaccinium myrtillus* L.), entre outros, constituem atualmente um foco de investigação dada a potencial relevância para a promoção da saúde e prevenção de doenças¹⁴⁻¹⁷. Estes frutos apresentam baixo valor calórico, abundância em fibra e em micronutrientes e constituem importante fonte dietética de antioxidantes naturais, principalmente compostos fenólicos¹⁸⁻²⁰.

A *Rubus idaeus* L. é uma cultura emergente em Portugal com importância comercial crescente, principalmente na produção fora de época, nomeadamente na cultura de Outono/Inverno^{21,22}. A cultura de framboesa tem aumentado consideravelmente e os frutos produzidos no nosso país apresentam boa qualidade, destinando-se maioritariamente ao mercado de exportação²³. Apenas cerca de 5% da framboesa nacional é comercializada em Portugal sobretudo através das grandes superfícies de distribuição alimentar²¹.

A planta da framboesa pertence à família das *Rosaceae*, género *Rubus*, subgénero *Idaeobatus*. Este subgénero compreende cerca de duas centenas de espécies sendo a *Rubus*

INTRODUÇÃO

idaeus L. é a espécie mais divulgada na Europa e na América do Norte²⁴. Em termos botânicos, a framboesa não é uma *baga* mas um agregado múltiplo de pequenas drupas formado pela junção de vários ovários da mesma flor, aderentes a um receptáculo comum²⁵. Cada drupa é constituída por uma semente dura, envolvida por polpa²⁶. A proporção de sementes no fruto representa 3 a 10%²⁷⁻²⁹. Após a abscisão do fruto maduro aquando da colheita, o receptáculo permanece ligado à planta e, consequentemente, o fruto fica oco com uma estrutura frágil que o torna perecível, sendo a conservação da framboesa fresca limitada.

As variedades cultivadas de framboesa dividem-se em dois grupos segundo os seus hábitos de frutificação^{10,25,30}: remontantes (p. ex. ‘Polka’, ‘Amira’, ‘Erica’ e ‘Himbo-top’) e não remontantes (p. ex. ‘Tulameen’ e ‘Glen Ample’). Em Portugal predominam *Rubus idaeus* L. de fruto vermelho, sabor agridoce, aroma agradável e polpa com pequenas sementes e textura granulada²⁶. A produção nacional deste pequeno fruto tem maior expressão no Alentejo Litoral (Odemira), na Beira Interior (Fundão), em Trás-os-Montes (Bragança) e no Ribatejo e Oeste²².

1. NUTRIENTES E NÃO NUTRIENTES PRESENTES NA FRAMBOESA

1.1 Caracterização nutricional

Os frutos de *Rubus idaeus* L. constituem uma escolha alimentar saudável. A framboesa fresca é um alimento com baixa densidade energética (até 52 kcal.100g⁻¹), resultado sobretudo do seu baixo teor em açúcares (4,1 - 5,1 g.100g⁻¹), naturalmente rico em nutrientes essenciais ao bom funcionamento do organismo humano³¹⁻³⁴.

Este pequeno fruto contém ainda proteínas (1,2 g.100g⁻¹), um teor reduzido em lípidos (0,40 – 0,65g.100g⁻¹) e em sódio (1 – 3 mg.100g⁻¹) e quantidades diminutas de outros minerais, vitaminas, p. ex. folatos (21 – 33 µg.100g⁻¹), e de fitoquímicos diversos, incluindo compostos fenólicos³¹⁻³⁴. Os dados de tabelas de composição de alimentos mostram que a framboesa é rica em vitamina C e constitui uma fonte de fibra e, em certos casos, de folatos e de manganês^{31,32,34}.

INTRODUÇÃO

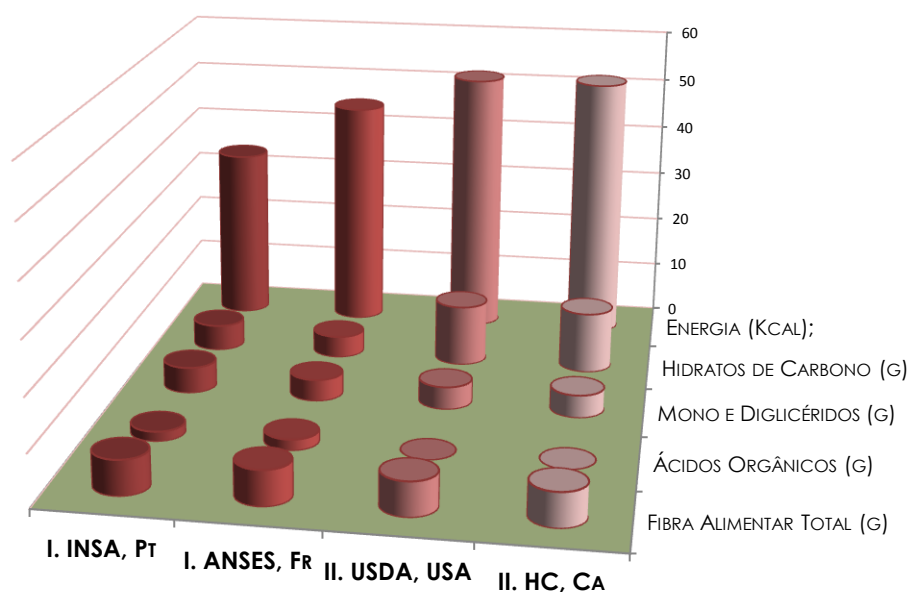


Figura 1.1 - Aspectos de características nutricionais de framboesas europeias^I e norte-americanas^{II}

O valor energético relativo a 100g de framboesas frescas disponível nas Tabelas de Composição de Alimentos Portuguesa (I. INSA, abreviatura de Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge, PT)³¹, Francesa (I. ANSES, abreviatura de *Agence Nationale de Sécurité Sanitaire de l'Alimentation, de l'Environnement et du Travail*, FR)³⁴, dos Estados Unidos da América (II. USDA, abreviatura de *U.S. Department of Agriculture*, US)³² e do Canadá (II. HC, abreviatura de Health Canada, CA)³³ sugere que os ecótipos europeus são menos calóricos que os norte-americanos: 34, 45,1 e 52 Kcal, respectivamente (Figura 1.1). No entanto, o baixo valor energético indicado pela Tabela de Composição de Alimentos Portuguesa resulta da não contabilização da energia proveniente das fibras alimentares e dos ácidos orgânicos. Considerandos os fatores de conversão destes constituintes explicitados na legislação vigente³⁵, 100 g de framboesas portuguesas têm 48,5 Kcal, um valor energético ligeiramente superior ao que consta da Tabela Francesa.

INTRODUÇÃO

1.2 Componentes químicos presentes na framboesa

O fruto fresco (FF), regra geral perfumado e de sabor ligeiramente ácido, é constituído principalmente por água ($84,3 - 85,75 \text{ g.100g}^{-1}$ FF), fibra ($3,7 - 6,7 \text{ g.100g}^{-1}$ FF) e açúcares ($4,25 - 5,1 \text{ g.100g}^{-1}$ FF) como a sacarose, glucose e, sobretudo, frutose ($> 50\%$ do total de açúcares)^{31,32,34,36}. Os ácidos orgânicos ($1,9 \text{ g.100g}^{-1}$)³¹, principalmente o ácido cítrico (97% dos ácidos totais)³⁷ e ácido málico são componentes minoritários da framboesa vermelha madura. A qualidade de framboesas frescas baseia-se essencialmente no tamanho, em atributos sensoriais e em aspetos composicionais, normalmente humidade, acidez titulável, pH, teores em sólidos solúveis, ° Brix e, frequentemente, vitamina C e teores em açúcares e ácidos orgânicos (Tabela 1.1).

Tabela 1.1 - Parâmetros utilizados na avaliação da qualidade de frutos frescos de *Rubus idaeus* L.

PARÂMETRO	CONTEÚDO (Mínimo – Máximo)	Referências
pH	2,65 – 3,87	38-42
Humidade (%)	79,2 – 89,6	39,41,43,44
Extrato Seco (%) *	10,4 – 20,8	39,41,43,44
Sólidos Solúveis (° Brix)	5,5 – 14,7	26,38,41,42,45-49
Acidez Titulável (g ác. Cítrico/L)	10,0 – 25,5	37,38,41,42,45,47,49
Glucose (g/L)	18,0 – 22,0	47,50
Frutose (g/L sumo FF)	24,0 – 32,0	47,50
Sacarose (g/L)	ND – 1,1	47,50
Ácido Cítrico (g/L)	10,8 – 27,7	45
Ácido Málico (g/L)	ND – 1,7	45
Ácido Ascórbico (mg/100 g FF)	15,4 – 46,9	37,38,40,46,51-53

* valores calculados dos resultados do teor em humidade; FF- fruto fresco; ND – não detetado.

A framboesa vermelha é um fruto edível que contém pequenas sementes amarelas (1000 sementes pesam cerca de $1,5 \text{ g}$)⁵⁴. Ao contrário da polpa, as sementes apresentam baixo teor em água, um conteúdo em óleo elevado e um teor em proteína igualmente elevado: respetivamente, $13,6 \text{ g}$, $10,5$ a $18,7 \text{ g}$ e $6,5 \text{ g.100g}^{-1}$ de semente⁵⁴⁻⁵⁶.

INTRODUÇÃO

1.3 Compostos fenólicos presentes na framboesa

Os frutos de *Rubus idaeus* L. maduros, prontos-a-consumir, são abundantes em fitoquímicos, principalmente compostos fenólicos flavonóides e não-flavonóides^{57,58}. Na planta, estes metabolitos secundários, intervêm no seu crescimento e desenvolvimento, nomeadamente na pigmentação dos frutos, nas suas características organolépticas e estabilidade oxidativa, em mecanismos antioxidantes, de proteção da radiação da luz UV e de extinção de radicais livres gerados durante o processo fotossintético, e na resistência a doenças, em funções antimicrobianas e antifúngicas, entre outras^{59,60}. Os fitoquímicos flavonóides apresentam um esqueleto comum (C₆-C₃-C₆) e estão largamente distribuídos em alimentos de origem vegetal. Os flavonóides de framboesas compreendem sobretudo as antocianinas e, em menor concentração, flavan-3-óis e flavonóis. Os fitoquímicos não-flavonóides incluem predominantemente taninos hidrolisáveis (elagitaninos) e outros presentes em quantidade diminuta ou vestigial: taninos condensados (proantocianidinas), ácidos fenólicos nomeadamente ácidos hidroxibenzóicos (C₆-C₁) e hidroxicinâmicos (C₆-C₃), e lignanos.

Os dados da bibliografia relativos ao conteúdo total em compostos fenólicos, em flavonóides totais e antocianinas totais da framboesa, encontram-se reunidos na Tabela 1.2. Na Tabela 1.3 são apresentados dados relativos à composição fenólica de frutos maduros de *Rubus idaeus* L.. Os dados apresentados nestas Tabelas mostram uma amplitude de variação elevada que pode ser atribuída a diferenças nas condições de extração, procedimentos analíticos e métodos de quantificação empregues, para além de fatores genéticos, edafoclimáticos, agronómicos, culturais e tecnológicos. O perfil fenólico deste fruto exhibe igualmente variações importantes, quantitativas e qualitativas, ao longo do desenvolvimento e maturação do fruto⁷⁷ e entre colheitas de anos consecutivos³⁸.

Tabela 1.2 Teores totais em fenóis, flavonóides e antocianinas de frutos de *Rubus idaeus* L.

PARÂMETRO	TEOR	Referências
Fenóis Totais (mg EAG/100g FF)	57,5 – 2062,3	15,37,39,41-44,46,57,59,61-67
Flavonóides Totais (mg EC/100g FF)	9,6 – 279,3	15,61,68-70
Antocianinas Totais (mg EC3G/100g FF)	2,1 – 325,5	15,39,42,43,46,61,68,71

EAG – equivalentes de ácido gálico; EC – equivalentes de (+) - catequina; EC3G – equivalentes de cianidina - 3-glucósido; EAT – equivalentes de ácido tânico.

INTRODUÇÃO

Tabela 1.3 - Composição fenólica de framboesas vermelhas frescas (*Rubus idaeus* L.)

CLASSE	SUB-CLASSE	COMPOSTO (Referência)	TEOR (Referência) (mg/100g FF)
FLAVONÓIDES	FLAVANÓIDES ANTOCIANINAS	Cianidina-3-soforósido ^{8,38,39,66,72-80}	22,4 ⁸⁰ ; 25,4 ⁷⁶ ; 49,9 ⁶⁶
		Cianidina-3-glucosilrutinosido ^{8,38,39,66,72-79}	7,2 ⁷⁶ ; 10,6 ⁶⁶
		Cianidina-3-glucósido ^{8,38,39,66,72-81}	5,7; 3,9; 12,5 ⁶⁶
		Cianidina-3-rutinosido ^{38,39,66,72-80}	0,8; 2,3; 4,5 ⁶⁶
		Cianidina-3-xilosilrutinosido ^{39,73-75,77,78}	
		Cianidina-3,5-diglucósido ^{39,73,77,78}	
		Cianidina-3-sambubiósido ^{8,77}	
		Pelargonidina-3-glucósido ^{8,39,73,75,77-79,81}	0,12 ⁷⁶ ; 0,4 ⁶⁶
		Pelargonidina-3-glucosilrutinosido ^{8,39,72,73,75-79}	0,10 ⁷⁶
		Pelargonidina-3-soforósido ^{8,72,73,75-78}	0,06 ⁷⁶
		Pelargonidina-3-rutinosido ^{66,74-77,79}	0,005 ⁷⁶ ; 0,2 ⁶⁶
	FLAVAN-3-ÓIS	(+) -Catequina ^{79,82,83} (+) -Epicatequina ^{66,79,82,83}	1,1 ⁶⁶
ÁCIDOS FENÓLICOS	FLAVONÓIS	Quercetina-3-glucósido ^{8,9,66,84}	0,2 ⁶⁶
		Quercetina-3-glucoronido ^{9,66,77}	0,5 ⁶⁶
		Quercetina-3-rutinosido ^{8,9,77}	
		Quercetina-3-galactósido ⁸	
		Quercetina galactosilramnósido ^{8,9}	
		Quercetina ⁸³	4,7 ⁸⁵
		Canferol glucuronido ⁷⁷	
		Canferol glucósido ⁸⁴	1,0 ⁸⁴
	ÁCIDOS HIDROXICINÂMICOS	Ácido cafeíco ^{83,86,87}	1,03 ⁸⁶ ; 0,89 ⁸⁷
		Ácido <i>p</i> -coumárico ^{83,86,87}	3,50 ⁸⁶ ; 1,39 ⁸⁷
		Ácido cinâmico ⁸⁷	0,27 ⁸⁷
		Ácido ferúlico ⁸⁶	0,85 ⁸⁷ ; 3,15 ⁸⁶
		Ácido clorogénico ⁸⁷	0,85 ⁸⁷
		Ácido procatechuico ⁸⁶	4,32 ⁸⁶
		Ácido sirínico ⁸⁶	1,77 ⁸⁶
		Ácido salicílico ⁸⁶	0,51 ⁸⁶
		Ácido sináptico ⁸⁶	1,25 ⁸⁶ ; 0,27 ⁸⁷
		Ácido vanílico ⁸⁶	1,85 ⁸⁶ ; 1,04 ⁸⁷
	ÁCIDOS HIDROXIBENZÓICOS	Ácido gálico ^{82,86,87}	26,1 ⁸⁶ ; 21,5 ⁸⁷
		Ácido elágico ^{8,66,75,78,88}	4,08 – 16,47 ⁸⁹
		Ácido <i>p</i> -hidroxibenzóico ^{83,86,87}	11,01 ⁸⁶ ; 1,82 ⁸⁷
TANINOS	TANINOS HIDROLISÁVEIS ELAGITANINOS	Sanguina H-6 ^{8,38,39,72,73,75,78,79,81,88}	76; 14,4 -16,3 ³⁹
		Lambertianina C ^{8,38,39,72,73,75,78,88}	36,8 - 74,7 ⁸⁹
		Sanguina H-10 ^{72,75,88,89}	31; 4,6 - 8,3 ³⁹
	TANINOS CONDENSADOS PROANTOCIANIDINAS	Procianidina, Propelargonidina	4,2 ⁹⁰ (*); 11,0 ⁹¹ (*)
LIGNANOS		Secoisolariciresinol ⁹²	0,02 ⁹²

(*) Estes valores foram convertidos a mg/100 g FF, considerando um extrato seco de 14%.

INTRODUÇÃO

Os genótipos de *Rubus idaeus* L. apresentam diferenças significativas no respeitante ao conteúdo em compostos fenólicos, flavonóides e antocianinas totais^{54,56,68,69,71}. Segundo alguns autores, o efeito da cultivar sobre a composição fenólica é mais importante que a influência de fatores ambientais como temperatura, luz e condições do solo^{49,68}. No entanto, de acordo com Remberg *et al.*⁵⁰ o impacto específico dos diferentes fatores edafoclimáticos sobre a composição fenólica da framboesa vermelha está ainda pouco investigado. Os resultados de um estudo sobre a influência da temperatura de crescimento na qualidade de frutos frescos da cv. Glen Ample sugerem que a flutuação da temperatura poderá contribuir para um aumento na concentração em fitoquímicos fenólicos face a frutos mantidos a temperaturas constantes⁵⁰.

Os compostos fenólicos maioritários da framboesa vermelha são elagitaninos^{11,77} e antocianinas. A ocorrência de elagitaninos nos alimentos está limitada a alguns frutos de baga, nomeadamente framboesa, e frutos secos¹⁰.

Os elagitaninos são taninos hidrolisáveis complexos que apresentam pelo menos um grupo hexahidroxidifenol (HHDP) esterificado com uma molécula de açúcar, vulgarmente a glucose, ou a outros compostos polihidroxilados^{59,64,93,94}. No reino vegetal, os elagitaninos podem ser encontrados sob a forma de monómeros, oligómeros ou polímeros complexos. Nos tecidos das plantas e em solução estes fitoquímicos sofrem reações de polimerização e de hidrólise. As reações de polimerização conduzem à sua insolubilização e/ou à sua ligação covalente a componentes da parede celular. Na presença de ácidos ou bases, as ligações éster dos elagitaninos são hidrolisadas e o HHDP cicliza espontaneamente em ácido elágico^{48,59,94}. O HHDP é um precursor biogenético do ácido elágico, um derivado dimérico do ácido gálico, pouco solúvel em água^{66,94}. O ácido elágico pode ser encontrado em plantas e em alimentos processados, na forma livre, conjugado com vários açúcares, ou polimerizado, constituindo elagitaninos solúveis em água, simples ou complexos^{48,59,94}.

Koponen *et al.*⁹⁵ determinaram por HPLC-DAD o teor de elagitaninos e de ácido elágico e seus glicósidos em extratos metanólicos de 33 alimentos vulgarmente consumidos na Finlândia entre 2003 e 2005. Os frutos de *Rubus idaeus* L. analisados em 2003 continham menos 20% de elagitaninos e menos 21% de ácido elágico e seus derivados. Condições edafoclimáticas diversas, práticas culturais distintas e/ou, eventualmente, diferentes

INTRODUÇÃO

cultivares poderão ter concorrido para tal variação já que os frutos estudados foram adquiridos em mercados locais da cidade finlandesa de Kuopio. O doce de framboesa analisado apresentava teores em elagitaninos e ácido elágico muito inferiores: 74,1 e 2,3, respectivamente, mg de EAE/ 100g FF, representando apenas cerca 23% e 49% do teor referido para o fruto fresco. Estes dados contrariam a alegação de Bakkalbasi *et al.*⁵⁹ e o reportado por Zafrilla *et al.*⁸⁴.

A framboesa contém sanguiina-H6 (4 grupos HHDP, 2 unidades glucosil e 2 unidades galhoil), o elagitanino maioritário, lambertianina C (6 grupos HHDP, 3 unidades glucosil e 3 unidades galhoil) e sanguiina-H10 (3 grupos HHDP, 2 unidades glucosil e 2 unidades galhoil) (Tabela 1.3). Mullen *et al.*⁹⁶ caracterizaram pela primeira vez os elagitaninos da framboesa vermelha. Os extratos metanólicos da cv. Glen Ample analisados por HPLC-DAD-MS, apresentaram teores elevados de sanguiina H-6 e conteúdos relativamente mais reduzidos de lambertianina C: 76 e 31 mg de EAG/100 g FF, respectivamente. Nestes frutos, o conteúdo em ácido elágico livre foi de apenas 0,11 mg EAG/100 g FF. Mais tarde, além dos elagitaninos já referidos, identificaram sanguiina H-10 e um elagitanino dimérico similar ao nobotanino A e à malabatrina B⁹. Borges *et al.*⁸ e González-Barrio *et al.*⁷⁵, confirmaram a presença de sanguiina H-6 e de lambertianina C em extratos metanólicos de framboesa (frutos adquiridos no mercado⁸ e frutos da cv. Glen Ample⁷⁵) analisados por HPLC-PDA-MSⁿ.

As proporções relativas de sanguiina H-6 e de lambertianina C nos frutos estudados pouco diferem, representando 76% e 24% e 81% e 11% dos elagitaninos totais, respectivamente^{8,75}. O teor em ácido elágico, nas suas formas livre e conjugadas, foi igualmente analisado nos trabalhos acima indicados. O conteúdo em ácido elágico livre apresentado nestes estudos foi aproximadamente 1,1 e 2,6 μmol EAE/100 g FF (32% e 46% do ácido elágico total, respectivamente)^{8,75}.

Ao contrário dos elagitaninos, as antocianinas são polifenóis comuns em diversos alimentos, nomeadamente em pequenos frutos^{95,97,98}. Em 2006, Wu *et al.*⁹⁷ reportaram a prevalência de antocianinas em 100 alimentos vulgarmente consumidos nos US. As framboesas vermelhas continham em média 92,1 mg de ECG/100 g de FF: 4 vezes o teor médio do morango, 40 vezes o referido para a maçã Gala e apenas 13% e 24% do valor

INTRODUÇÃO

reportado para a framboesa preta e para o mirtilo. Apesar da relativa abundância deste pequeno fruto em antocianinas, o seu contributo para o aporte diário estimado nestes polifenóis era semelhante ao da maçã: 7,4% face a 5,6%, representando uma ingestão diária/pessoa de 0,93 e 0,70 mg de antocianinas, respectivamente⁹⁷.

As antocianinas são pigmentos hidrossolúveis que contribuem para a cor vermelha do fruto e assumem um papel relevante na atração de insetos de polinização e em mecanismos de proteção contra a luz excessiva^{98,99}. Quimicamente, estes polifenóis são glicósidos polihidroxilados ou polimetoxilados de derivados do 2-fenil-1-benzopirílio ou sais de flavílio¹⁰⁰. As formas desglicosiladas ou aglíconas são quimicamente instáveis pelo que raramente ocorrem na natureza⁹⁸. A framboesa é caracterizada pela presença de soforósidos, glucósidos e rutinósidos de cianidina e de pelargonidina. Neste pequeno fruto, as cianidinas prevalecem sobre as pelargonidinas representando, respectivamente, cerca de 98% e 2% das ATs^{95,97}. As antocianinas maioritárias são frequentemente cianidina-3-soforósido, cianidina-3-glucosilrutínósido e cianidina-3-glucósido^{73,96} e as antocianinas minoritárias são geralmente pelargonidina-3-soforósido, de cianidina-3-rutinósido e de pelargonidina-3-soforósido, pelargonina-3-glucósido e pelargonina-3-glucosilrutínósido^{8,37}.

O perfil de antocianinas é característico de um dado tecido e tem sido usado em classificações taxonómicas¹⁰¹. O genótipo e as condições edafoclimáticas influenciam a composição em antocianinas de *Rubus idaeus* L. Entre genótipos observam-se diferenças na proporção relativa das antocianinas maioritárias, p. ex., nas cv. Tulamine, Prelude e Autumn Britten a cianidina-3-soforósido e a cianidina-3-rutinósido representaram, respectivamente, 50,8%, 25,6% e 23,3% e 6,1%, 12,7% e 25,6% do total das antocianinas identificadas⁷³. Remberg *et al.*³⁷ apresentaram dados evidenciando diferenças no perfil em antocianinas de frutos de uma dada variedade desenvolvidos a temperaturas diferentes. O conteúdo em cianidina-3-soforósido nos frutos desenvolvidos a 12°C, 18°C e 24°C foi de, respetivamente 18,2, 14,2 e 8,7 mg/100 g FF e o teor de cianidina-3-rutinósido para aquelas temperaturas ambientais foi 1,8, 4,5 e 6,6 mg/100 g FF³⁷.

Flavan-3-óis são flavonóides que incluem desde os monómeros simples (+)-catequina e o seu isómero (-)-epicatequina, a galhocatequinas e proantocianidinas oligoméricas e poliméricas³.

INTRODUÇÃO

Proantocianidinas são conhecidas como taninos condensados. Regra geral, estes polifenóis são misturas de oligómeros e de polímeros de flavan-3-óis ligados principalmente mediante ligações C4 --> C8 e/ou C4 --> C6 (proantocianidinas do tipo B). A framboesa contém flavan-3-óis *cis* e *trans*, nas formas monomérica e oligomérica (Tabela 1.3). Este fruto vermelho apresenta procianidinas e propelargonidinas heterogêneas do tipo B, com 2 a 10 unidades condensadas, constituídas por (epi)catequina e (epi)afzelequina¹⁰².

Flavonóis e ácidos fenólicos são considerados compostos fenólicos minoritários da framboesa^{8,66,103}. Os flavonóis da framboesa compreendem sobretudo glicósidos e glucurônidos de quercetina (Tabela 1.3), nomeadamente quercetina-3-glucósido e a quercetina-3-glucurônido^{15,9,66,73,77}. À semelhança do já referido para outros compostos fenólicos, abordagens metodológicas diferentes poderão contribuir, pelo menos em parte, para as grandes diferenças observadas nos dados da bibliografia analisada.

O perfil fenólico da framboesa vermelha inclui igualmente ácidos fenólicos, hidroxicinâmicos (C₆-C₃) e hidroxibenzóicos (C₆-C₁) sobretudo conjugados (94% do total)⁸⁶, nas formas glicosilada e esterificada (Tabela 1.3). Após hidrólise ácida ou alcalina, foram identificados em extratos de *Rubus idaeus* L. os ácidos gálico (cerca de 48% dos ácidos fenólicos totais), *p*-hidroxibenzóico (20 % dos ácidos fenólicos totais), ácidos procatechuico, ácido *p*-coumárico e ácido ferúlico (respectivamente, 8%, 6% e 5,7 % dos ácidos fenólicos totais) e, finalmente, dos ácidos minoritários vanílico, sináptico, cafeíco, sirínico e salicílico (1,7 % dos ácidos fenólicos totais)^{86,87}. O trabalho de Russell *et al.*⁸⁶ põe em realce os ácidos fenólicos potencialmente biodisponíveis, e possíveis responsáveis por efeitos benéficos para a saúde.

A framboesa vermelha apresenta ainda quantidades reduzidas de secoisolariciresinol, um lignano largamente distribuído no reino vegetal: 0,14 mg de secoisolariciresinol/100g de matéria seca, ou seja, cerca de 0,02 mg de secoisolariciresinol/100g de FF^{104,8105}. O secoisolariciresinol é um lignano comum em vários frutos, nomeadamente em pequenos frutos, e vegetais que apresenta propriedades fitoestrogénicas, entre outras^{92,106}.

INTRODUÇÃO

1.4. Metodologias de preparação de amostra e análise de compostos fenólicos

A análise dos compostos fenólicos de *Rubus idaeus* L., à semelhança de outros microconstituintes, envolve a sua extração e eventual purificação, e a sua identificação e quantificação. A determinação destes fitoquímicos nos frutos é influenciada pela sua natureza química, pelo método de extração adotado, pela preparação e conservação da amostra, pelo método analítico, entre outros factores⁶⁰.

No processo de extração dos compostos fenólicos neste tipo de matriz tem sido descrita a utilização de metanol, etanol, acetona em diferentes proporções com água e em meio que pode ser ou não acidificado. A escolha da melhor solução extratante depende dos compostos alvo a estudar. No estudo das antocianinas de *Rubus idaeus* L. o sistema extratante mais usado foi metanol acidificado^{71,74,76,95,107,108}. Segundo Vrhovsek *et al.*, o rendimento da extração de elagitaninos de framboesas frescas com uma mistura de acetona: água (70:30, v/v) foi muito superior ao conseguido com metanol aquoso (60:40, v/v)⁴⁸. Recentemente, Türkben *et al.*⁸³ avaliaram o efeito de diferentes sistemas de extração, aquosos e metanólicos, na concentração de compostos fenólicos de framboesa vermelha. Em termos qualitativos não foram observadas diferenças nos compostos extraídos em ambos os casos. No respeitante à eficácia da extração, esses investigadores constataram que os solventes contendo 40 a 60% de água foram mais eficientes que o metanol na extração dos ácidos elágico, ferúlico e cafeico⁸³, corroborando as observações de trabalhos publicados anteriormente⁴¹. No entanto, Mattila *et al.*⁸⁷ e Russell *et al.*⁸⁶ extraíram ácidos fenólicos de frutos, incluindo a framboesa, com metanol aquoso acidificado (85:15, v/v) e acetato de etilo aquoso acidificado, respectivamente.

Alguns autores promovem hidrólise ácida e/ou alcalina^{66,67,61} nas amostras, antes de serem analisadas. A limpeza dessas amostras, nomeadamente a eliminação de açúcares é feita normalmente por extração em fase sólida (C18) e constituiu um passo prévio à análise do perfil fenólico por técnicas separativas^{66,67}.

Regra geral, os parâmetros químicos são determinados com base em métodos normalizados. Na Tabela 1.4. apresentam-se diferentes métodos descritos na bibliografia, usados na análise e quantificação de compostos fenólicos em extratos de framboesa.

INTRODUÇÃO

Tabela 1.4 Análise e quantificação de compostos fenólicos em extratos de *Rubus idaeus* L.: métodos adotados na bibliografia analisada

METODOLOGIAS	Referências
Métodos Espectrofotométricos:	
•Ensaio de Folin-Ciocalteu	37,39,41,42,46,54,61,62,67,68,71,74,77,80,88,96,108,109
•Ensaio colorimétrico do pH diferencial	37,39,46,62,68,71,74,77,88,96,108
•Ensaio colorimétrico por complexometria com cloreto de alumínio	68,74
Métodos Cromatográficos e/ou Espectrométricos:	
•HPLC-UV/Vis	86
•HPLC-DAD ou PDA	29,42,48,62,66,72,76,80,84,87,89,90,95,108-111
•HPLC-MS ⁿ	8,9,39,48,56,66,71,73- 75,77,78,81,83,86,88,96,107,108,112
•HPLC-CoulArray TM	113
•HPLC-PDA-CAO	8,73
•UPLC/Q-TOF-MS	89,114
•HR HPLC/Q-TOF-MS	89,114

HPLC-CoulArrayTM - HPLC equipado com um detector coulométrico que permite detetar compostos com base nas suas propriedades eletroquímicas; HPLC-PDA-CAO - HPLC-DAD acoplado a um sistema de deteção da capacidade antioxidante dos analitos baseado no método TEAC; UPLC/Q-TOF-MS - sistema UPLC acoplado a um espectrómetro de massa Q-TOF, muito usado na identificação de metabolitos e de produtos de degradação; MALDI-TOF-MS - espectrómetro de massa com analisador de tempo voo e ionização/dessorção a laser assistida por matriz.

Os métodos espectrofotométricos são relativamente simples e possibilitam a quantificação global de compostos fenólicos e de classes ou subclasses destes fitoquímicos (Tabela 1.4). Assim o conteúdo global em compostos fenólicos da framboesa é usualmente avaliado pelo método espectrofotométrico de Folin-Ciocalteu (Tabela 1.4). Este método possibilita uma estimativa do teor respeitante ao conjunto dos compostos fenólicos das várias subclasses presentes nestes pequenos frutos. Esta metodologia baseia-se na capacidade redutora dos fenóis mas é inespecífica, apresentando como interferentes compostos antioxidantes e compostos redutores não fenólicos, nomeadamente ácido ascórbico, açúcares e sulfito. Considerando a abundância da framboesa em vitamina C, o teor em compostos fenólicos totais obtido por este método constitui uma sobrestimação do seu conteúdo em compostos fenólicos real.

O teor de antocianinas totais é frequentemente determinado pelo método colorimétrico da diferença de pH e o teor em flavonóides totais pode ser quantificado pelo método

INTRODUÇÃO

colorimétrico por complexometria com cloreto de alumínio^{68,74}. No seu conjunto, os parâmetros obtidos por estes três métodos espectrofotométricos possibilitam uma caracterização global da composição fenólica deste fruto e uma comparação com outros alimentos.

Os teores em taninos hidrolisáveis totais e em taninos condensados totais podem ser estimados, respectivamente, pelos ensaios colorimétricos por complexometria do iodato de potássio e da vanilina. Estes métodos têm sido empregues na quantificação daqueles polifenóis em alimentos ricos em taninos, nomeadamente na romã¹¹⁵. Na bibliografia consultada não foram encontrados dados relativos a estes parâmetros para frutos de *Rubus idaeus* L..

Os compostos fenólicos de *Rubus idaeus* L. compreendem um grupo vasto de fitoquímicos (Tabela 1.3). O perfil fenólico de extratos de framboesa tem sido avaliado por técnicas cromatográficas sobretudo por HPLC-DAD^{77,107} e por HPLC-DAD-MSⁿ, predominantemente em fase reversa (Tabela 1.4).

Como referido, embora sejam fáceis de usar, os métodos espectrofotométricos estão sujeitos a interferências por parte de outros componentes das amostras pelo que os métodos separativos deverão ser utilizados preferencialmente na quantificação amostras.

O perfil fenólico de extratos de framboesa tem sido avaliado por técnicas cromatográficas em fase reversa (HPLC), utilizando diferentes modos de deteção como detetores de vetor de díodos, fluorescência, eletroquímicos e mais recentemente de espetrometria de massa (MS)^{27,86}(Tabela 1.4). Este último, a espetrometria de massa, é caracterizada pela sua seletividade e sensibilidade. A informação fornecida por este modo de deteção está relacionada com a estrutura química e fragmentos tipo caraterísticos que permitem também a quantificação de um modo seletivo. Assim podem apontar-se como vantagens de acoplamento entre técnicas separativas e a espetrometria de massa: (i) redução de efeitos de matriz que resultam da complexidade das amostras em análise; (ii) separação de isómeros; (iii) informação importante e complementar como o tempo de retenção; (iv) quantificação mais exata para cada metabolito. Na Figura 1.2 são apresentados os esquemas referentes a um equipamento de HPLC acoplado a um espectrómetro de massa do tipo triplo quadrupolo com uma fonte eletrospray (ESI) utilizado numa gama de massas relativamente

INTRODUÇÃO

mais baixa (até cerca de 2000 Da) e a um equipamento MALDI-TOF-MS, ou seja, um analisador de tempo voo e ionização/dessorção a laser assistida por matriz (MALDI-TOF, do inglês *Matrix-assisted laser desorption/ionization- time-of-flight mass spectrometer*), acoplado a um espectrômetro de massa, normalmente usado na análise de grandes moléculas como proteínas.

Os equipamentos de espectrometria de massa suscetíveis de serem utilizados não se restringem no entanto aos apresentados. Dada a diversidade existente disponível no mercado, quando da escolha do sistema analítico a usar, deverá ter-se em conta o tipo de composto e sua concentração na amostra, bem como o fim em vista (quantificação ou identificação) de modo a fazer a escolha mais adequada e que permita um maior número de aplicações.

INTRODUÇÃO

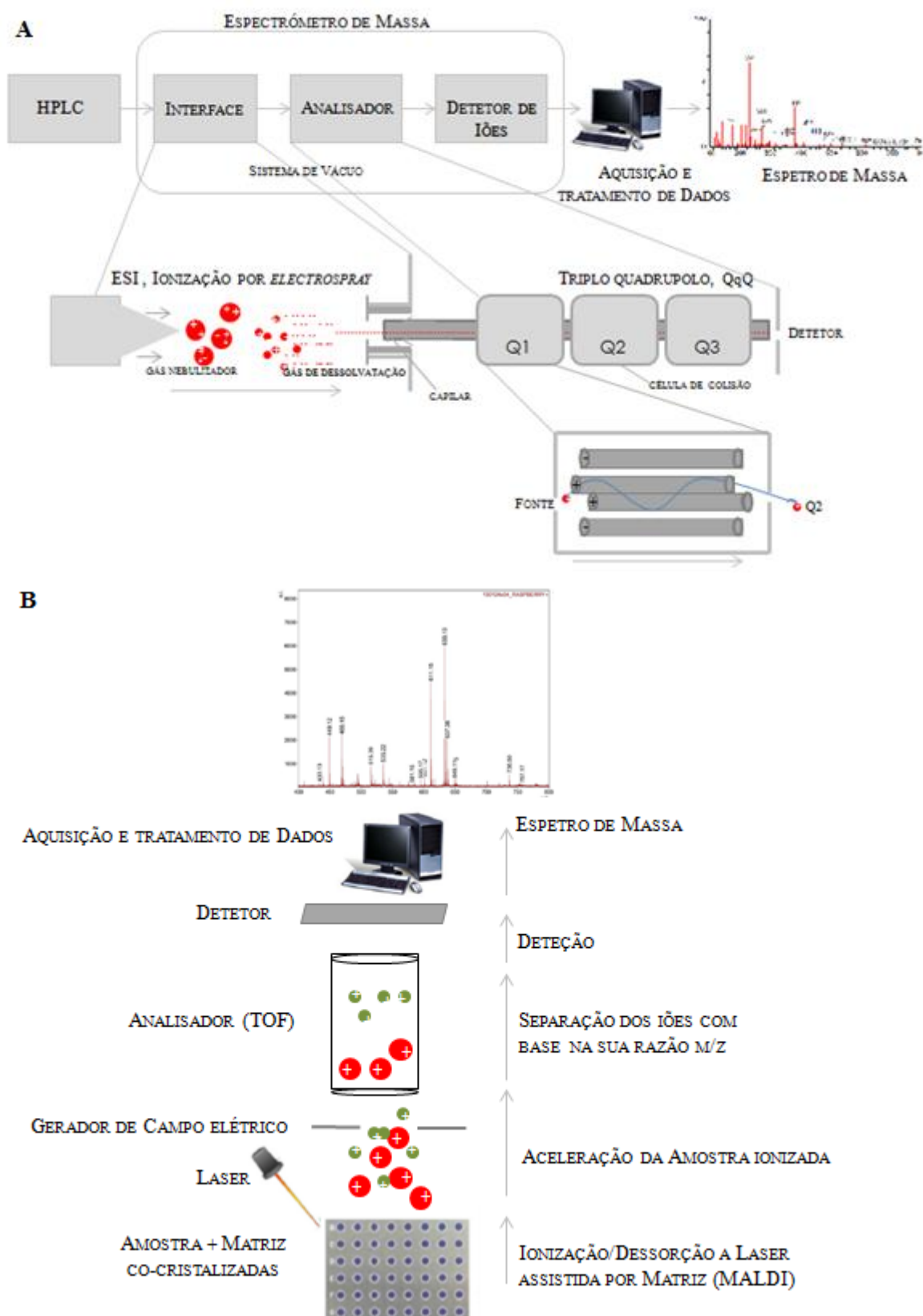


Figura 1.2 - Esquema da análise num sistema de HPLC acoplado a um espectrómetro de massa do tipo triplo quadrupolo (A); equipamento MALDI-TOF-MS (B).

(adaptado de Soto¹²⁰ (A) e de Croxatto *et al.*¹¹⁶ (B)).

INTRODUÇÃO

2. ATIVIDADE BIOLÓGICA

Na última década, estudos *in vitro* e *in vivo* revelaram que os compostos fenólicos da framboesa vermelha apresentam uma gama alargada de atividades biológicas: antioxidante, anti-inflamatória, antiproliferativa e anticancerígena, antimicrobiana e respeitantes a obesidade e à gestão do teor de glucose no sangue, entre outras. Os estudos de intervenção nutricional em humanos relativos à ação específica da framboesa vermelha são escassos e recentes. A distribuição no tempo do alvo das investigações publicadas na *Pubmed* relativas à bioatividade de *Rubus idaeus* L. entre 1999 e Novembro de 2015 encontram-se na Figura 1.3. ‘Red raspberry’ e ‘raspberry’ foram os descritores usados na pesquisa realizada naquela base de dados. A Tabela 1.5 apresenta um resumo das conclusões relatadas em alguns desses estudos publicados até 2010, altura em que foi delineada a parte experimental da presente investigação. A Tabela 1.6 reúne aspetos relevantes de estudos realizados entre 2011 e 2015.

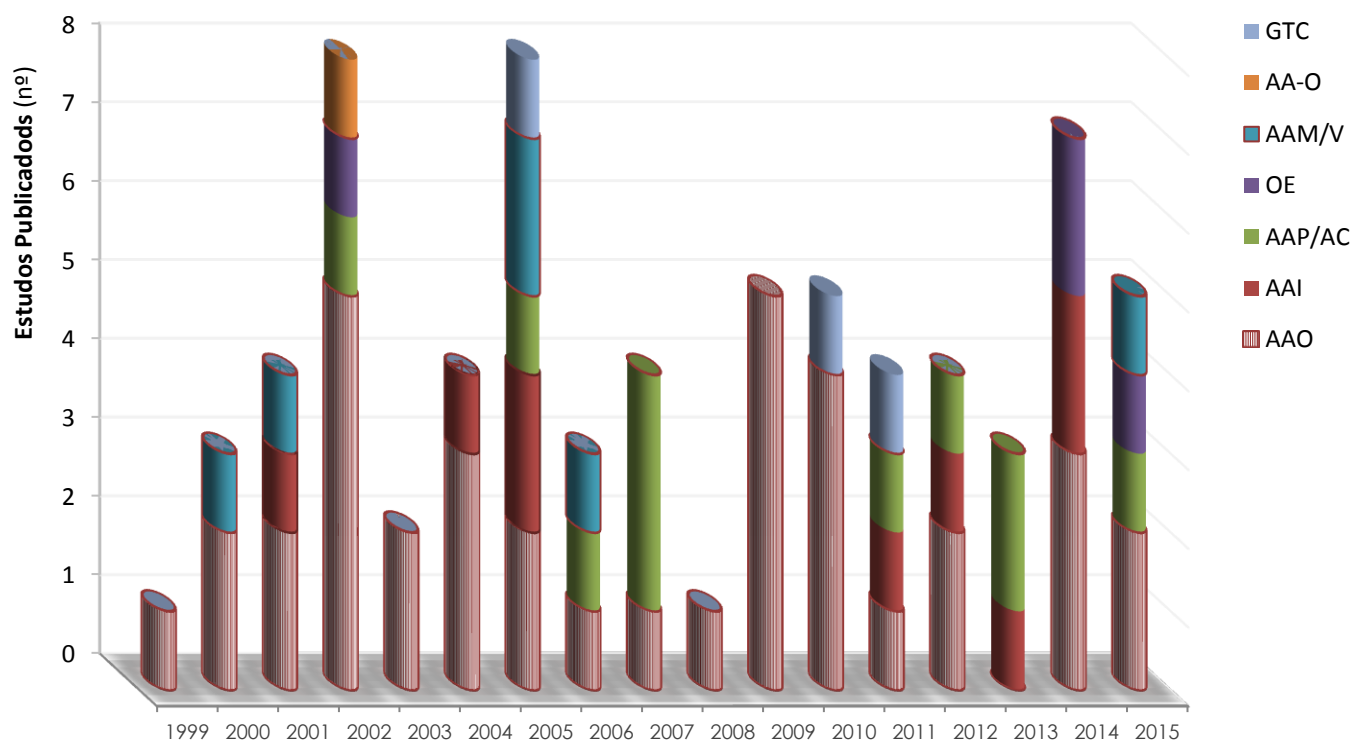


Figura 1.3 - Bioatividade de frutos de *Rubus idaeus* L.: estudos publicados na Pubmed entre 1999 e 2015 (Novembro)

AAO – atividade antioxidante; AAI - atividade anti-inflamatória; AAP/AC - atividade antiproliferativa e anticancerígena; AAM/V - atividade antimicrobiana/antiviral; AA-O - atividade anti-obesidade; GTG – atividade relativa à gestão do teor em glucose no sangue; OE – outros efeitos.

INTRODUÇÃO

Tabela 1.5 Potenciais efeitos biológicos benéficos da ingestão de *Rubus idaeus* L. na saúde: aspetos relevantes de estudos publicados e citados na Pubmed entre 1999 e 2010.

EFEITOS BIOLÓGICOS		Referências
Antioxidante (AAO)	Os frutos de <i>Rubus idaeus</i> L. apresentam uma actividade antioxidante e uma capacidade sequestradora de radicais livres <i>in vitro</i> elevadas.	37,41,42,46,47,51,53,65,74,77,80,82,84,108,117-127
	As propriedades antioxidantes da framboesa parecem dever-se principalmente a elagitaninos, antocianinas e vitamina C.	8,128
Anti-inflamatório (AAI)	Extratos de framboesa vermelha e frações destes, contendo só elagitaninos ou só antocianinas, foram efetivos contra a produção do mediador pró-inflamatório prostaglandina E ₂ em macrófagos ativados.	123
	Extratos concentrados de antocianinas de <i>Rubus idaeus</i> L. exibiram igualmente, <i>in vitro</i> , uma actividade inibitória das cicloxigenases 1 e 2, comparável à dos anti-inflamatórios comerciais ibuprofen e naproxen.	118
Antiproliferativo /Anticancerígeno (AAP/AC)	Os compostos fenólicos da framboesa vermelha, nomeadamente o ácido elágico, poderão ter uma ação químico-protetora do cancro.	68,72
	Extratos de <i>Rubus idaeus</i> L. inibiram o crescimento de células HeLa, de células HepG ₂ e de células HT29 <i>in vitro</i> e modularam a ativação de genes associados à detoxificação de xenobióticos.	68
Antimicrobiano /Antiviral (AAM/V)	Extratos fenólicos de framboesa inibiram <i>in vitro</i> a actividade de microrganismos patogénicos, nomeadamente em estirpes bacterianas, <i>B. cereus</i> , <i>Campylobacter jejuno</i> , <i>Salmonella</i> e <i>E.coli</i> .	67,109,112,129,130
Saúde Vascular (OE)	Extratos contendo elagitaninos de <i>Rubus idaeus</i> L. revelaram-se, potentes vasodilatadores de vasos da aorta de coelho com endotélio intacto, <i>in ex vivo</i> .	77
Anti-obesidade (AA-O)	A cetona da framboesa evidenciou uma ação anti-obesidade <i>in vivo</i> , em ratos., e um extrato de framboesa vermelha inibiu a actividade da lipase pancreática <i>in vitro</i> . A inibição da actividade daquela enzima tem sido usada no tratamento da obesidade,	131,132
Gestão do teor de Glucose no Sangue (GTG)	Extratos de elagitaninos e de antocianinas deste fruto inibiram a digestão de hidratos de carbono <i>in vitro</i> , interagindo com α -amilases e α -glucosidase, respectivamente, indiciando um potencial para o melhoramento do controlo da diabetes	133

INTRODUÇÃO

Tabela 1.6 Potenciais efeitos biológicos benéficos da ingestão de *Rubus idaeus* L. na saúde: aspetos relevantes de estudos publicados e citados na Pubmed entre 2011 e 2015.

EFEITOS BIOLÓGICOS		Referências
Antioxidante (AAO)	Diferentes extratos de frutos de <i>Rubus idaeus</i> L. e frações isoladas destes, ricas em elagitaninos e antocianinas (60% e 8%, respetivamente), avaliados <i>in vitro</i> por métodos distintos apresentaram uma capacidade antioxidante (CAO) elevada. Foram encontradas correlações significativas entre o teor em fenóis totais e a CAO medida <i>in vitro</i> .	69,70,134-139
	Foi demonstrado que os elagitaninos da framboesa contribuem de modo significativo para a CAO deste pequeno fruto.	138
Anti-inflamatório (AAI)	Estudos <i>in vitro</i> em modelos celulares evidenciaram propriedades anti-inflamatórias de extratos de framboesa ricos em compostos fenólicos.	15,140-142
	Extratos ricos em polifenóis da framboesa, administrados diariamente em modelos experimentais de inflamação (p.ex. de colite aguda, do edema induzido pela carragenina e de artrite reumatóide) mostraram ter efeitos anti-inflamatórios significativos, contrariando a progressão da patologia induzida.	141-143
Antiproliferativo /Anticancerígeno (AAP/AC)	Extratos de <i>Rubus idaeus</i> L., ricos em compostos fenólicos, incluindo de framboesas produzidas em Portugal, administrados em doses distintas, foram efetivos na redução da viabilidade celular e na proliferação de células cancerígenas, <i>in vitro</i> , de modo dependente da dose, em diferentes modelos celulares.	144-148
	Alguns dos estudos publicados incluem abordagens mecanísticas, apresentando vias de sinalização para os efeitos anti-angiogénicos e anti-metastásicos encontrados.	145,148
Antimicrobiano /Antiviral (AAM/V)	Extratos aquosos de <i>Rubus idaeus</i> L. aplicados numa dose 1,25 – 2,5% (m/v) foram efetivos na inibição <i>in vitro</i> de bactérias patogénicas, gram – e gram +, incluindo <i>E. coli</i> O 157, <i>Salmonella typhimurium</i> , <i>B. cereus</i> , <i>V. Cholerae</i> . Neste estudo ficou demonstrada a capacidade do extrato de framboesa para inibir a transdução de genes virulentos de <i>V. Cholerae</i> .	149
Outros efeitos (OE)	Um extrato de <i>Rubus idaeus</i> L. e frações solúveis deste, ricas em antocianinas, mostraram, <i>in vivo</i> em ratos, efeitos metabólicos benéficos	134
	Um polissacárido hidrossolúvel da framboesa (RCP-II) inibiu, <i>in vitro</i> , a glicação de proteínas; a cetona da framboesa promoveu a diferenciação de células estaminais em osteoblastos, <i>in vitro</i> , num modelo celular.	150,151
Gestão do teor de Glucose no Sangue (GTG)	Extratos de framboesas vermelhas e amarelas inibiram a α -amilase, <i>in vitro</i> , em concentrações baixas, confirmando os dados de estudos anteriores.	152

INTRODUÇÃO

A comprovação científica da ação benéfica de antioxidantes naturais da dieta no stresse oxidativo tem estimulado a investigação nesta área, nomeadamente no que se refere à actividade de compostos fenólicos. Este interesse parece justificar a predominância da investigação sobre a atividade antioxidante deste pequeno fruto (52% do total). Em oposição, o estudo da atividade anti-inflamatória de *Rubus idaeus* L., parece ser uma área científica promissora, menos explorada (13% do total). Em 2010 encontrámos apenas 4 publicações respeitantes ou de algum modo relacionadas com esse potencial efeito biológico benéfico para a saúde humana: dois estudos *in vitro*^{118,123} e dois estudos de intervenção em humanos, inespecíficos e inconclusivos, que incluíram framboesas na dieta fornecida a grupos de indivíduos da população-alvo^{153,154}. Entre 2011 e 2015 foram publicados 5 estudos relativos atividade anti-inflamatória (Tabela 1.6), um dos quais corresponde ao trabalho desenvolvido nos *itens* 1 e 2 do capítulo II.

2.1 Atividade antioxidante

A Capacidade Antioxidante, abreviadamente CAO, de um alimento de origem vegetal resulta de interações sinérgicas e redox entre as diferentes moléculas presentes no alimento, nomeadamente polifenóis, carotenoides e vitaminas C e E^{121,155,156}. Para Rao *et al.*¹⁰³ a CAO poderia ser considerada um parâmetro da qualidade nutricional destes alimentos, indicador da presença de compostos bioativos benéficos para a saúde humana. Segundo aqueles investigadores norte-americanos, a diversidade de ensaios usados na avaliação da CAO e a variabilidade de medições entre amostras de alimentos têm dificultado a sua adoção e limitado as comparações dos dados disponíveis¹⁰³. A avaliação da atividade antioxidante potencial de um alimento pode ser realizada através de mecanismos relativos ao resgate de espécies reativas (RS), de oxigénio e de azoto (ROS e RNS), entre outras, à complexação de iões metálicos e à modelação da resposta celular¹⁵⁷. Nesta avaliação é comum aplicarem-se ensaios que avaliem diferentes mecanismos de ação de antioxidantes sobre ROS e RNS, dada a possibilidade da coexistência de mecanismos diversos na matriz biológica^{119,120}. As ROS e RNS que, regra geral, reagem com as macromoléculas biológicas são, principalmente, os radicais peróxido (ROO[•]), hidróxido (OH[•]), singuleto de oxigénio (¹O₂), anião superóxido (O₂⁻) e de monóxido de azoto (NO[•]) e os não radicais, peróxido de hidrogénio (H₂O₂) e o ozono (O₃)¹⁵⁸. Destas, as espécies mais relevantes parecem ser os

INTRODUÇÃO

radicais O_2^- , ROO^\bullet e OH^\bullet e NO^\bullet . Os dados da avaliação da CAO de framboesas ilustram bem esse facto (Tabela 1.7).

Tabela 1.7 Avaliação da capacidade antioxidante potencial de frutos de *Rubus idaeus* L.

PARÂMETRO	TEOR	Referências
Resgate do ROO^\bullet		
ORAC ($\mu\text{mol TE}/100\text{g FF}$)	2140	117
ORAC_{FL} ($\mu\text{mol TE}/100\text{g FF}$)	1849 - 5292 ^a	53,80,120,127,159
HORAC_{FL} ($\mu\text{mol TE}/100\text{g FF}$)	4765 ^b	120
LORAC_{FL} ($\mu\text{mol TE}/100\text{g FF}$)	160 ^c	53
ORAC-PGR ($\mu\text{mol TE}/100\text{g FF}$)	1453	
Resgate do Radical DPPH ($\mu\text{mol ET}/100\text{g FF}$)	3806 – 12759 ^{**d, e}	74,127
Redução do ião Fe^{2+}		
FRAP ($\mu\text{mol } Fe^{2+}/100\text{g FF}$)	2030 – 4303	8,37,39,80,119,155
Resgate do Radical ABTS^{•+} ($\mu\text{mol ET}/100\text{g FF}$)	6436 - 11710 ^{d,e}	74
TEAC ($\mu\text{mol ET}/100\text{g FF}$)	1679 - 1846	80,155
TRAP, Resgate total de radicais ($\mu\text{mol ET}/100\text{g FF}$) (reação de peroxidação)	1048	155
CUPRAC ($\mu\text{mol ET}/100\text{g FF}$)	4716 – 10804 ^{d,e}	74
Inibição da Oxidação das LDL ($\mu\text{g/mL}$ de extrato)	- 14,9 para 1,4 $\mu\text{g/mL}$; 96,7 para 4,2 $\mu\text{g/mL}$	123

ABTS - 2,2'-azinobis-(3-etilbenzotiazolína-6-sulfonato); ORAC - *Oxygen Radical Antioxidant Capacity*; ^a ORAC_{FL} = ^b H-ORAC_{FL} + ^c L-ORAC_{FL}; ^d Extrato metanólico; ^e Extrato aquoso; FL - fluoresceína sódica; ET - equivalente Trolox; PGR - vermelho de pirogalol; DPPH - 2,2-difenil-1-picrilhidrazil; CUPRAC- 'copper reducing antioxidant capacity'; FRAP - 'Fer Reduction Antioxidant Power'; TEAC - 'Trolox equivalent antioxidant capacity'; TRAP - *Radical-trapping antioxidant parameter*; ^{**} Calculado para um teor médio de humidade de 87,5%.

Os métodos mais usados na avaliação da CAO de *Rubus idaeus* L. e de frutos em geral, incluem ensaios capazes de avaliar a capacidade de resgate de radicais ROO^\bullet , (p. ex. o ensaio ORAC (Capacidade antioxidante do radical oxigénio), para substâncias hidrofílicas e a adaptação deste ensaio para compostos lipofílicos, embora este último assumia pouca importância para a framboesa), métodos que estimam a capacidade de inibição e resgate do radical OH^\bullet (ressonância paramétrica eletrónica, EPR) e técnicas que possibilitam uma avaliação da capacidade de inibição da oxidação de LDL, por radicais ROO^\bullet , entre outros (Tabela 1.7). Os ensaios FRAP (Poder antioxidante de redução do ferro) e TRAP (Potencial antioxidante de resgate de radicais livres) monitorizam a capacidade redutora de

INTRODUÇÃO

antioxidantes da amostra, nomeadamente de antioxidantes não enzimáticos, que nestes ensaios interferem com radicais ROO[•] gerados por determinados compostos (p. ex. o 2,4,6-Tri(2-piridil)-s-tiazina no ensaio FRAP) ; o método TEAC (Capacidade antioxidante de equivalentes de Trolox) – mede a capacidade da amostra para extinguir o ABTS^{•+} em ambientes lipofílicos e hidrofílicos^{155,160}. Os métodos ORAC, FRAP e TEAC também podem ser empregues na determinação da CAO de fluidos biológicos como urina e plasma^{160,161}. Nestes casos, esses ensaios possibilitam uma abordagem global e relativa da CAO de diversos fluidos biológicos e/ou da sua evolução em condições clínicas distintas.

A abundância de compostos antioxidantes naturais na framboesa constitui um argumento incentivador do consumo deste fruto. Estudos publicados no início deste século defendem que a ingestão de frutos ricos em antioxidantes naturais pode contribuir para a proteção de doenças no organismo humano¹⁵⁵. No entanto, a evidência científica acumulada tem revelado que a CAO *per se* pode não estar correlacionada com benefícios para a saúde humana^{128,162}. Trata-se sem dúvida de uma área científica emergente, algo controversa. Vários investigadores têm reportado listas de valores de CAO relativas a vários alimentos, incluindo *Rubus idaeus* L. de proveniências distintas, recorrendo a metodologias diversas. Dos alimentos vulgarmente consumidos, a framboesa fresca tem sido repetidamente classificada nos dez primeiros lugares, com valores de CAO elevados^{103,128,155,163}. Beekwilder *et al.*¹²⁸ reportaram valores de CAO, de diferentes ensaios, relativos a sete frutos e vegetais geralmente consumidos. A framboesa apresentava os valores mais elevados, seguida de morango, kiwi, brócolos, alho-porro bravo, maçã e de tomate.

Os principais antioxidantes individuais da framboesa são elagitaninos, antocianinas e vitamina C^{8,73,75}. Estes constituintes foram responsáveis, por, respectivamente, 54%, 25% e 17% da CAO de frutos maduros da cv. Tulamine⁷³. 4% da CAO deste fruto foi atribuída à presença de proantocianidinas, apesar do procedimento cromatográfico usado por Beekwilder *et al.* impossibilitar a separação destes polifenóis⁷³. A investigação foi realizada por HPLC-DAD acoplado, a um sistema pós-coluna baseado no ensaio TEAC. Os antioxidantes individuais foram identificados num sistema HPLC-PDA-QTOF-MS/MS, usando as mesmas condições cromatográficas e a mesma coluna. Em 2010, Borges *et al.*⁸ relataram dados similares. Este trabalho, realizado por técnicas cromatográficas similares às empregues por Beekwilder *et al.*, confirmou serem elagitaninos, antocianinas e vitamina C

INTRODUÇÃO

os antioxidantes maioritários de framboesas maduras. No seu conjunto, estes constituintes contribuíram em cerca de 85% para a CAO e individualmente em 58,3%, 16,5% e 10,5%, respectivamente⁸. A CAO individual de constituintes de mirtilo, groselhas, preta e vermelha, e arando foi igualmente investigada por Borges *et al.*⁸. Os resultados obtidos mostraram serem as antocianinas os antioxidantes maioritários destes frutos, contribuindo para a CAO em, respectivamente, 16,5%, 84%, 73%, 21%, e 39%⁸. No entanto, o conteúdo e a contribuição relativa da vitamina C e dos compostos fenólicos detetados nestes pequenos frutos para a CAO diferem. Assim sendo, é espectável que a framboesa vermelha apresente atividades biológicas distintas destes frutos.

Os frutos de *Rubus idaeus* L. contêm proantocianidinas poliméricas^{90,111}. Gu *et al.* identificaram e quantificaram estes compostos em extratos aquosos de acetona purificados por HPLC-MS² em fase normal¹¹⁴. Nos sistemas HPLC em fase reversa aqueles polifenóis ficam retidos na coluna ou eluem como picos não resolvidos, impossibilitando a medição do contributo destes fitoquímicos para a capacidade antioxidante da framboesa⁸.

No organismo humano, a actividade antioxidante e pró-oxidante dos compostos fenólicos e de seus metabolitos depende do pH do meio, das propriedades quelatantes e da biodisponibilidade destes compostos, entre outros fatores¹²⁶. A presença de compostos com propriedades redutoras e oxidantes no sangue e noutros fluidos biológicos pode interferir na atividade antioxidante/pró-oxidante enquanto competem para o substrato (radicais livres, ROS e iões metálicos de transição)¹²⁶.

Os estudos de intervenção em humanos obtidos na pesquisa bibliográfica sobre a ação benéfica da framboesa no organismo não incluíram a avaliação da CAO de fluidos biológicos. No entanto, foram publicadas investigações que avaliaram a ação antioxidante de extratos de *Rubus idaeus* L. na prevenção, *in vitro*, de danos oxidativos de proteínas e de lípidos. O Liposoma é um modelo empregue no estudo das propriedades e estrutura das membranas dada a semelhança estrutural com a da matriz lipídica das membranas celulares. Viljanen *et al.*¹²² mostraram a eficácia de extratos de framboesa na inibição da oxidação de proteínas (lactoalbumina) e na da proteção de lípidos em lipossomas (inibição de hexanal e de hidroperóxidos dieno conjugados) de fenómenos de peroxidação lipídica catalisados por ferro. Neste estudo os extratos de framboesa testados, nomeadamente extratos de apenas

INTRODUÇÃO

elagitaninos e de antocianinas daqueles frutos, possibilitaram proteção contra a oxidação de proteínas e de lípidos no modelo de oxidação Lactoalbumina-Lipossoma. O efeito antioxidante sobre as proteínas foi superior ao observado nos lípidos e a ação antioxidante diferiu entre os compostos fenólicos individuais considerados. Vuorela *et al.*¹²³ obtiveram igualmente um efeito antioxidante de extratos de *Rubus idaeus* L. (do fruto, de elagitaninos, antocianinas e ácido elágico) na prevenção da oxidação de lipoproteínas em lipossomas (Tabela 1.7).

A avaliação da CAO de fluidos biológicos com os testes anteriormente citados, ORAC, FRAP ou TEAC tem um significado biológico limitado já que aqueles ensaios *in vitro* não são realizados em condições fisiológicas de pH e de temperatura, entre outros aspetos. Para se debelarem algumas destas dificuldades foram desenvolvidos métodos capazes de avaliar a atividade antioxidante em culturas celulares. Wolfe *et al.*¹⁵⁹ determinaram a atividade antioxidante intracelular de alguns frutos na presença de radicais peróxido, em culturas de células do carcinoma do fígado humano, HepG2. Yokomizo e Moriwaki¹⁶⁴ avaliaram a ação antioxidante de flavonóides em culturas de células de carcinoma do cólon humano, Caco-2, face a uma situação de stresse oxidativo induzido por peróxido de hidrogénio. Em ambos os casos os extratos testados foram efetivos na redução da actividade dos ROS gerados, resultado da capacidade de resgate daquelas espécies por parte dos compostos antioxidantes contidos nesses extratos. Esta abordagem parece interessante pois, ainda que compreenda uma medida da ação antioxidante *in vitro*, é realizada em células, num ambiente mais próximo do que se verifica em sistemas biológicos. No entanto, os estudos publicados relativos à atividade antioxidante potencial de frutos de *Rubus idaeus* L. não têm contemplado a atividade antioxidante intracelular.

2.2 Atividade anti-inflamatória

Assiste-se atualmente ao aumento de doenças crónicas não transmissíveis (NCDs) a um nível global, nomeadamente de doenças cardiovasculares (DCV), obesidade, diabetes *mellitus* tipo II, doença de Alzheimer, esclerose múltipla e cancro¹⁶⁵. Em 2008, no nosso planeta morreram cerca de 33 milhões de pessoas (58% do total de mortes) de NCDs¹⁶⁶. Processos inflamatórios não infecciosos têm sido implicados na etiologia dessas

INTRODUÇÃO

patologias^{165,167,168}. Estas doenças apresentam concentrações elevadas de marcadores inflamatórios e de células inflamatórias ativadas no local do tecido afetado e na circulação sistêmica¹⁶⁷. O desenvolvimento de uma resposta inflamatória autorregulada é essencial à defesa da integridade dos organismos vivos, contra potenciais agressões de natureza física, química ou biológica. Quando um estímulo nocivo é detetado no organismo, o sistema imunológico responde inicialmente e diretamente através do seu sistema inato, onde se inclui a componente inflamatória^{169,170}. No entanto, embora benéfica e indispensável ao bom funcionamento e à sobrevivência do organismo, a inflamação pode ser prejudicial para células e tecidos sãos, e, conseqüentemente contribuir para o desenvolvimento de doenças¹⁶⁷. A inflamação patológica envolve a perda de tolerância e/ou processos regulatórios disfuncionais¹⁷¹. Tal pode verificar-se quando a reação inflamatória é muito forte (p.ex. se a infecção é severa), prolongada (p.ex. quando o estímulo agressor é difícil de erradicar), desencadeada por antígenos nocivos (p.ex. em desordens alérgicas) ou anormalmente dirigida contra antígenos do próprio organismo (como acontece em doenças autoimunes)^{167,172}. Geralmente, as doenças ou condições que apresentam inflamação bem reconhecida são tratadas com fármacos anti-inflamatórios, gerais ou específicos¹⁶⁷. Considerado o impacto negativo da inflamação na saúde, a investigação e/ou o desenvolvimento de substâncias anti-inflamatórias assume hoje particular relevância¹⁷³.

A inflamação (do latim, *inflammatio*) constitui um mecanismo fisiológico complexo, relativamente inespecífico, capaz de distinguir entre o próprio e o não próprio, que defende o organismo da agressão sofrida, elimina células e tecidos necróticos resultantes do processo ofensivo e defensivo e inicia a reparação estrutural e funcional das lesões causadas em células ou tecidos. A inflamação é uma resposta estereotipada que envolve alterações bioquímicas, fisiológicas e imunológicas diversas no local lesado, mediadas por vários compostos inflamatórios, produzidos pelas células lesadas e por células do sistema imunológico, que prontamente ocorrem ao local em resposta à percepção dos estímulos considerados agressivos, sem reconhecimento da sua identidade específica^{167,172,174}. A resposta inflamatória compreende uma interação complexa entre agentes agressores, células do parênquima e componentes dos tecidos afetados, vasculatura, ambos elementos da matriz extracelular e componentes celulares do sangue, envolvendo vários mediadores químicos de origem celular e plasmáticos^{171,172,175}.

INTRODUÇÃO

Os compostos pró-inflamatórios envolvidos nesta resposta também podem lesar células saudáveis da vizinhança do local da inflamação^{174,176}. Normalmente, a resposta inflamatória é bem regulada, de modo a não promover danos excessivos ao hospedeiro, é autolimitada e resolve-se rapidamente¹⁶⁷.

A inflamação pode ser localizada, ocorrendo em locais anatómicos restritos, ou sistêmica, com manifestações em vários tecidos e órgãos¹⁷⁷. As respostas inflamatórias sistêmicas (p.ex. septicemia e choque anafilático), geralmente patológicas e descontroladas, são frequentemente letais em humanos e em animais¹⁷⁷.

Em termos fundamentais a inflamação pode ser classificada em aguda e crônica¹⁷⁴. A inflamação aguda é a resposta imediata do organismo agredido, é rápida (alguns minutos a dias) e é dominada por vasodilatação e aumento do fluxo sanguíneo e da permeabilidade capilar e pela acumulação predominante de neutrófilos¹⁷². Esta resposta pode ser desencadeada por vários tipos de estímulos: vulgarmente infeções microbianas, traumas promovidos por agentes químicos e físicos diversos, tecido necrosado incluindo isquemia, lesões químicas e físicas, corpos estranhos ou reações imunitárias contra substâncias do ambiente ou contra tecidos do próprio organismo¹⁷². Independentemente do tipo de estímulo considerado, no local lesado a resposta inflamatória inicial ou aguda manifesta-se por hiperemia, eritema ou rubor, edema, dor, calor e perda da função, e envolve interações diversas entre os vários tipos de células, residentes e não residentes, e relativas à produção e às respostas de diferentes mediadores químicos¹⁶⁷. Regra geral, esta inflamação envolve a eliminação do estímulo agressor, a inibição da expressão de mediadores pró-inflamatórios, o estímulo da expressão de mediadores anti-inflamatórios e a inversão das alterações vasculares indutoras do processo inicial de recrutamento de células imunológicas^{167,172,176}.

Quando a inflamação aguda não é completamente resolvida (p.ex. quando o estímulo inflamatório é difícil de evitar ou de eliminar ou quando persiste a libertação de mediadores pró-inflamatórios que destroem e renovam continuamente os tecidos) pode tornar-se crônica, ou seja, persistente, inadequada ou exagerada, com consequências patológicas para o organismo¹⁷⁸. A inflamação crônica pode durar semanas a anos e caracteriza-se por uma infiltração de linfócitos e de macrófagos, pela destruição de tecido resultado da libertação de mediadores inflamatórios, alguns distintos dos produzidos na resposta aguda, e reparação

INTRODUÇÃO

envolvendo proliferação vascular e fibrose dos tecidos¹⁷². Frequentemente ambas as respostas inflamatórias aguda e crônica coexistem, assumindo uma evolução e formas histológicas distintas¹⁷⁹.

A resposta inflamatória aguda compreende alterações vasculares e fenómenos celulares. As alterações vasculares incluem vasodilatação, resultado de alterações no calibre dos vasos que se traduzem no aumento do fluxo sanguíneo; aumento da permeabilidade vascular na sequência de alterações na parede dos vasos sanguíneos permitindo que proteínas do plasma deixem a circulação; ativação de células endoteliais possibilitando um aumento da adesão de leucócitos, sobretudo neutrófilos, e migração destes através da parede dos vasos sanguíneos^{167,172}. Os fenómenos celulares referem-se ao recrutamento de leucócitos da circulação sanguínea para o local da lesão, nomeadamente de neutrófilos, e à ativação destes para eliminarem o agente inflamatório^{172,180}.

No local lesado, as alterações vasculares iniciam-se imediatamente manifestando-se com intensidades distintas, dependendo da natureza e da intensidade do estímulo inflamatório^{172,181}. Após uma breve vasoconstrição, ocorre uma vasodilatação arteriolar e, consequentemente, um aumento do fluxo sanguíneo e a congestão dos leitos capilares jusantes. Esta expansão vascular é a causa da cor avermelhada (eritema) e do calor característicos da inflamação aguda. A vasculatura dilatada torna-se mais permeável, possibilitando o movimento de um fluido rico em proteínas para os tecidos extracelulares. Este fenómeno promove o aumento da pressão osmótica do fluido intersticial e, por consequência, um aumento da passagem de água do sangue para os tecidos, resultando na acumulação de um exsudato rico em soluto e proteínas do plasma (edema)¹⁷². A corrente sanguínea fica então mais concentrada em glóbulos vermelhos, a viscosidade aumenta e o fluxo desacelera até estagnar. À medida que se atinge a estase ou estagnação sanguínea inicia-se o recrutamento de leucócitos, principalmente de neutrófilos¹⁷². Na região inflamada também ocorre um aumento do fluxo de vasos linfáticos. A linfa ajuda na drenagem de fluido do edema, de leucócitos e de resíduos de células do espaço extracelular¹⁷².

Na fase inicial da reação inflamatória (6 a 24h), os neutrófilos constituem a maioria das células que migram para a área inflamada^{172,181}. Algumas horas mais tarde (24 a 48h) assiste-se à migração para o foco inflamatório de monócitos fagocitários (macrófagos)¹⁷². Os

INTRODUÇÃO

neutrófilos são potentes citotóxicos, encontram-se na circulação sanguínea em grande quantidade, movem-se mais rapidamente que outros leucócitos e podem ser rapidamente substituídos por precursores da medula¹⁸¹. O recrutamento ativo de leucócitos, nomeadamente de neutrófilos para os locais lesados requer a sua captura da corrente sanguínea e o rolamento, a adesão e a transmigração faseada dos mesmos através das paredes dos vasos sanguíneos para o tecido intersticial^{181,182}.

A cascata de adesão dos neutrófilos é uma sequência de fenómenos de adesão e de ativação, a partir da perspetiva de cada neutrófilo, que termina na infiltração destes leucócitos no local inflamado onde exercem os seus efeitos citotóxicos. Atualmente, para além das etapas tradicionais captura ou marginalização, rolamento, adesão e transmigração, compreende as etapas rolamento lento adesão firme ao endotélio ou espalhamento e, “rastejamento” intracelular (Figura 1.4)¹⁸². A transmigração pode ser paracelular ou transcelular¹⁸².

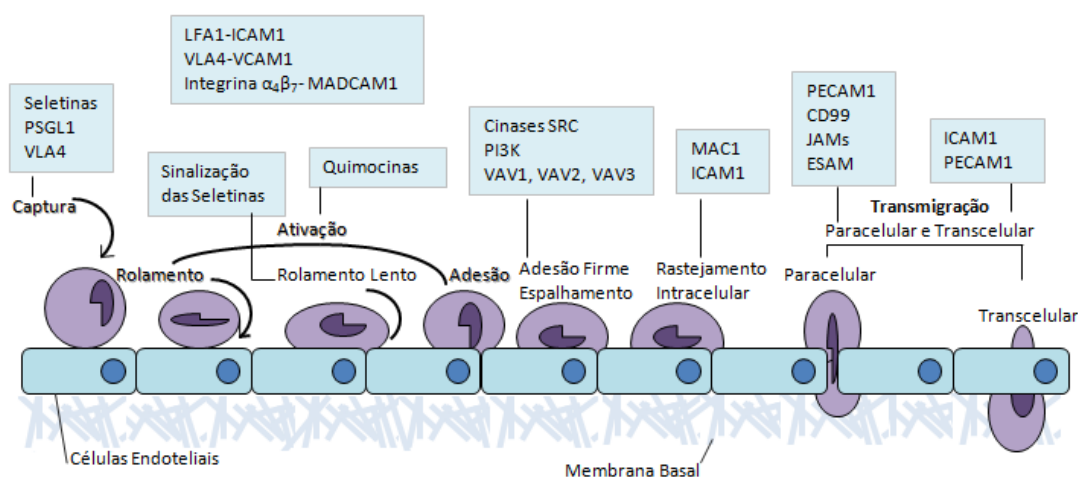


Figura 1.4 - Cascata de adesão dos leucócitos para os tecidos.
(Adaptado de Ley *et al.*¹⁸²)

Os passos originais apresentam-se a **negrito**: o **rolamento**, que é mediado por seletinas, a **ativação**, que é mediada por quimiocinas, e a **adesão**, que é mediada por integrinas.

Adicionalmente representaram-se a captura, o rolamento lento, o fortalecimento da adesão ou adesão firme e o espalhamento, o “rastejamento” intravascular, e a transmigração paracelular e transcelular. As moléculas -chave envolvidas em cada passo apresentam-se em caixas, concretamente: ESAM, molécula de adesão de células endoteliais - seletivo; ICAM1, molécula 1 de adesão intercelular; JAM, molécula de adesão juncional; LFA1, antígeno associado à função de linfócitos 1 (conhecido como integrina $\alpha\beta_2$); MAC1, antígeno de macrófagos 1; MADCAM1, adressina vascular da mucosa molécula de adesão celular 1; PSGL1, P -seletina glicoproteína ligante 1; PECAM1, molécula de adesão/células endoteliais plaquetas 1; PI3K, fosfoinositídeo 3-quinase; VCAM1, molécula de adesão celular vascular 1; VLA4, integrina $\alpha_4\beta_1$.

INTRODUÇÃO

O processo de recrutamento dos neutrófilos da corrente sanguínea inicia-se com a sua marginalização, ou seja, com a acumulação destas células na periferia da coluna de sangue de circulação, à medida a estase se instala. Na sequência deste evento as células endoteliais da região lesada são ativadas por mediadores inflamatórios produzidos localmente, entre os quais as citocinas interleucina 1 (IL-1) e fator de necrose tumoral α (TNF- α), expressando moléculas de adesão na sua superfície, as quais se ligam fortemente àqueles neutrófilos. Estas moléculas de adesão podem ser seletinas (proteínas com elementos estruturais semelhantes às lecitinas, que apresentam um domínio extracelular que apresenta grande afinidade para os glícidos), nomeadamente as seletinas P e L, integrinas (proteínas essenciais na adesão das células entre si e à matriz extracelulares) e proteínas membros da superfamília das imunoglobulinas como a VCAM-1 e as ICAM-1 e ICAM-2. As interações das seletinas com seus ligantes permitem que os leucócitos aderiram ao endotélio inflamado, em determinadas condições do fluxo de sangue¹⁸². Os neutrófilos ligam-se e desligam-se sucessivamente das seletinas L e P iniciando-se o rolamento, isto é, o movimento destes leucócitos ao longo da superfície do endotélio¹⁸². As integrinas são ativadas na superfície dos leucócitos, também participam no rolamento e são mediadoras da adesão firme dos leucócitos às células endoteliais inflamadas (p.ex. a integrina VLA4). A paragem dos leucócitos à superfície do endotélio é ativada por mediadores pró-inflamatórios, quimiocinas e por citocinas quimioatratoras, e é mediada pela ligação de integrinas de leucócitos com membros da superfamília das imunoglobulinas, expressas por células endoteliais, nomeadamente as VCAM-1 e ICAM-1¹⁸². Outras citocinas secretadas no local lesado, como as IL-1 e TNF- α ativam as células endoteliais para aumentarem a sua expressão de ligandos para as integrinas¹⁷². As moléculas de adesão estão diretamente implicadas na infiltração dos leucócitos no foco da inflamação. A migração de leucócitos através das paredes venulares envolve penetração da barreira de células endoteliais unidas por junções ocludentes, células endoteliais da membrana basal e perícitos¹⁸². Integrinas da família $\beta 1$, as VCAM-1, ICAM-1 e JAM, entre outras, participam ativamente no “rastejamento” intracelular e na transmigração dos leucócitos através do endotélio vascular (Figura 1.4). A extravasão dos leucócitos através do endotélio é o último passo da cascata de adesão dos leucócitos a células endoteliais e designa-se de diapedese¹⁸³. A diapedese ocorre sobretudo nas vénulas e a migração destas células para a fonte quimiotática ocorre por um gradiente de químico num

INTRODUÇÃO

processo designado de quimiotaxia, ativado por quimiocinas e outros mediadores químicos, entre outras substâncias quimiotáticas¹⁷².

A resposta inflamatória é desencadeada por diversas células do hospedeiro, como células epiteliais, dendríticas e fagócitos, entre outras, que apresentam recetores que reconhecem padrões moleculares comuns a agentes potencialmente nocivos nas suas células e tecidos, nomeadamente estruturas próprias de diversas células microbianas ou de células mortas¹⁷². O reconhecimento desses padrões moleculares é realizado por recetores transmembranares do tipo *Toll* e do tipo-C Lectinas e por recetores intracelulares dos tipos gene 1 induzíveis do ácido retinoico e de domínio de oligomerização de ligação de nucleótidos, RIG-I e NOD, que ativam inflamassomas¹⁸⁴⁻¹⁸⁶. Os recetores transmembranares do tipo *Toll* e do tipo-C Lectinas fazem o reconhecimento do meio extracelular e as famílias de recetores dos tipos RIG-I e NOD fazem a deteção de sinais de stresse ou de infeção nos compartimentos intracelulares¹⁸⁴. Os recetores transmembranares do tipo *Toll* são capazes de detetar estruturas moleculares de microrganismos extracelulares (p.ex. endotoxinas bacterianas e RNA de vírus)¹⁸⁷. A ativação da inflamação via estes recetores é capaz de induzir a maturação de células dendríticas, de ativar fatores de transcrição que estimulam a produção de mediadores inflamatórios (p.ex. citocinas), favorecendo a ativação de linfócitos T e o posterior desenvolvimento de uma resposta imunitária adaptativa. Os recetores intracelulares do tipo RIG-I assumem um papel importante na deteção de padrões moleculares de patogénios, nomeadamente de vírus, desencadeando a imunidade antiviral¹⁸⁵. Estes recetores detetam ligantes de RNA viral ou de RNA auto-replicado no citoplasma e sinalizaram a jusante a ativação do fator de transcrição para a produção do interferão tipo 1, IFN-1, e para transmitir a expressão do gene antiviral, induzindo uma resposta intracelular para controlar a infeção¹⁸⁵. Adicionalmente, os recetores do tipo RIG-I cooperaram em redes de sinalização por comunicação cruzada com recetores do tipo *Toll* e outros fatores para conferir imunidade inata e modular a resposta imunitária adaptativa¹⁸⁵. A regulação dos recetores do tipo RIG-I exerce-se a diversos níveis, desde a autorregulação para ligantes e co-fatores a modificações pós-transducionais, pelo que a regulação aberrante destes recetores ou desregulação das suas expressões pode ter consequências patológicas. Segundo alguns autores existem evidências científicas que sugerem que a desregulação dos programas de sinalização dos recetores do tipo RIG-I, nomeadamente no que se refere à indução da produção de IFN-1, poderá estar implicada no desenvolvimento de doenças autoimunes do

INTRODUÇÃO

foro reumatológico, nomeadamente de artrite reumatóide (AR)¹⁸⁸. Assim a compreensão dos processos de sinalização e de resposta dos recetores do tipo RIG-I poderá disponibilizar informações capazes de orientarem a terapêutica considerando a via metabólica destes visando novas aplicações imunológicas, nomeadamente para o controle de doenças autoimunes específicas^{185,188}. Os recetores intracelulares do tipo NOD são proteínas solúveis que se encontram no citoplasma capazes de, após reconhecimento antigénico (de padrões moleculares de células mortas como ATP extracelular, de cristais, nomeadamente de cristais de ácido úrico, ou de estruturas de microrganismos como a flagelina) ativarem inflamassomas, estruturas citoplasmáticas multiproteicas complexas que desencadeiam a produção de citocinas, importantes mediadores inflamatórios^{172,189}. A ativação do inflamassoma caspase-1 desencadeia a clivagem da forma inativa de potentes citocinas pró-inflamatórias, IL-1 β e IL-18, que por sua vez ativam leucócitos (neutrófilos e macrófagos)^{186,189}. Uma vez ativados os leucócitos fagocitam os agentes invasores e libertam radicais tóxicos de oxigénio e de azoto, eliminando-os e promovendo a morte da célula infectada¹¹⁷.

Os mediadores inflamatórios químicos são compostos pró e anti-inflamatórios do hospedeiro, de origem celular ou plasmática, que podem ser isoladas no local da inflamação e que, quando ativados, participam na resposta inflamatória, desencadeando, mantendo e/ou amplificando ou inibindo os diversos eventos envolvidos na reação inflamatória. Muitos destes compostos têm grande potencial para provocarem danos no organismo pelo que, na sua maioria, para atuarem têm de se ligar a recetores específicos em diferentes células-alvo e, uma vez ativados, têm um tempo de vida curto e as suas ações são fortemente reguladas¹¹⁷. Na Figura 1.5 apresentam-se alguns desses mediadores químicos que coordenam eventos nas respostas inflamatórias, aguda e crónica.

Os mediadores inflamatórios de origem celular são produzidos no local inflamado e compreendem mediadores já sintetizados, sequestrados em grânulos intracelulares, que são secretados aquando da ativação (p.ex. histamina), e mediadores sintetizados de novo aquando da estimulação (p.ex. derivados do ácido araquidónico e citocinas). Os mediadores plasmáticos sistémicos (p.ex. proteínas do complemento e cininas, nomeadamente bradicinina) são sintetizados no fígado, circulam no plasma como precursores inativos e são ativados por clivagem proteolítica no local da inflamação¹⁷².

INTRODUÇÃO

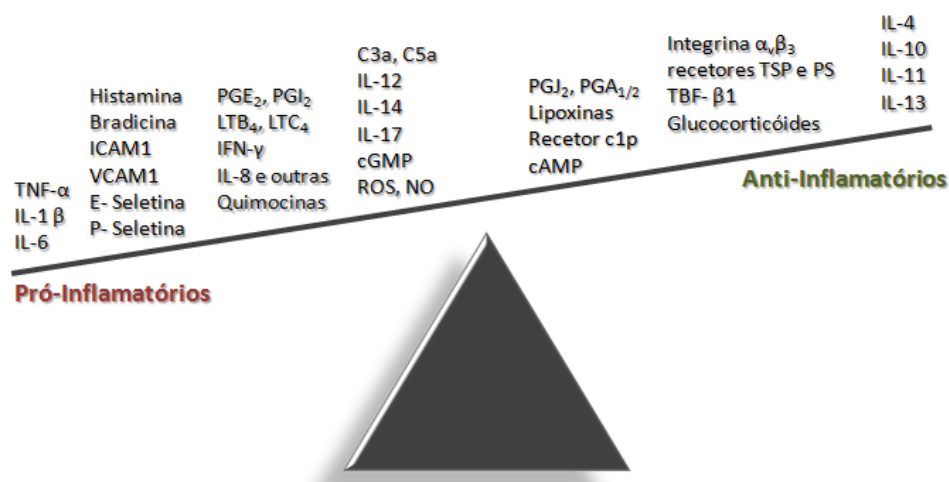


Figura 1.5 - Mediadores pró-inflamatórios e inflamatórios que intervêm nas respostas inflamatórias agudas e crônicas

(Adaptado de Lawrence *et al.*¹⁶⁹; Kumar *et al.*¹⁷²)

(da esquerda para a direita) TNF- α , fator de necrose tumoral- α ; IL, interleucina; ICAM1, molécula de adesão intercelular 1; VCAM1, molécula de adesão celular vascular 1; PG, prostaglandina; LT, leucotrieno; IFN- γ , Interferon γ ; C3a e C5a, proteínas do Sistema Complemento C3a e C5a; cGMP, guanosina monofosfato cíclico de 3,5; ROS, espécies reativas de oxigênio; NO, monóxido de azoto; cAMP, monofosfato de adenosina 3,5; TGF- β 1, fator transformador de crescimento- β 1; PS, fosfatidilserina; TSP, trombospondina.

Os mediadores inflamatórios celulares previamente sintetizados incluem as aminas vasoativas histamina e serotonina, eicosanóides derivados de lípidos, o fator de ativação das plaquetas, moléculas de adesão, citocinas, um grupo vasto de proteínas ou péptidos produzidos por diferentes tipos de células que assumem um papel muito relevante no desencadeamento e desenvolvimento da resposta inflamatória, RS, enzimas liposomais e neuropeptídeos^{172,190}. Os mediadores inflamatórios plasmáticos compreendem um conjunto de proteínas circulantes dos sistemas do complemento, da cinina e da coagulação¹⁷². Alguns destes mediadores inflamatórios são suscetíveis de escapar do foco da inflamação para a circulação sanguínea, podendo partir daí exercer efeitos sistêmicos, como p.ex, as citocinas pró-inflamatórias IL-6 (induz a síntese hepática da PCR) e TNF- α (provoca efeitos metabólicos no músculo esquelético, tecido adiposo e osso)¹⁶⁷. Estas citocinas pró-inflamatórias assumem um papel de destaque em diversos fenômenos inflamatórios.

Na resposta inflamatória aguda, histamina e serotonina são dos primeiros mediadores inflamatórios a serem libertados. A histamina encontra-se armazenada em grânulos, sobretudo em mastócitos adjacentes aos vasos sanguíneos^{191,192}. É libertada após desgranulação dos

INTRODUÇÃO

mastócitos imediatamente pós-percepção de diversos estímulos nocivos, nomeadamente certos neuropeptídeos (p.ex. a substância P) algumas citocinas e quimiocinas (p.ex. IL-1 e IL-8, respetivamente)^{191,192}. Em humanos, a histamina promove dilatação arteriolar, induz contração da musculatura lisa do endotélio e, conseqüentemente um aumento rápido da permeabilidade de vénulas e a formação de espaços interendoteliais, possibilitando a migração de leucócitos. É ainda suscetível de provocar libertação de neuropeptídeos sensoriais, de prostaglandinas (PG) e de ácidos monohidroxi-eicosatetraenóicos das células endoteliais gerando hiperalgesia e outros efeitos pró-inflamatórios^{191,192}. Uma vez libertada a histamina é prontamente inativada pela histaminase. Os grânulos das plaquetas armazenam serotonina (5-hidroxitriptamina) produzida por alguns neurónios e por células enterocromafins do duodeno¹⁹³. Na inflamação a serotonina é libertada durante a agregação plaquetária, induzindo vasoconstrição na coagulação sanguínea. Estudos recentes *in vitro* e *in vivo* sugerem que a serotonina participa no recrutamento de neutrófilos na inflamação aguda, promovendo o rolamento destes leucócitos resultado da liberação de corpos de Weibel-Palade a partir de células endoteliais¹⁹³.

Os eicosanóides derivados de lípidos, principalmente do ácido araquidónico (20:4 n-6) são importantes mediadores e reguladores de inflamação que intervêm em diversas etapas da resposta inflamatória¹⁶⁸. Estes compostos são gerados a partir de ácidos gordos polinsaturados com 20 átomos de carbono, principalmente a partir do ácido linoleico da dieta, presente no organismo na forma esterificada enquanto componente dos fosfolípidos da membrana celular¹⁶⁸. Os metabolitos derivados do ácido araquidónico incluem PG, TX, leucotrienos (LT), lipoxinas (LX) e prostaglandina-ciclopentonoênicas (Cy-PG)^{168,169,194}.

A biossíntese dos eicosanóides a partir do ácido araquidónico inicia-se com a ativação da fosfolipase A₂, na sequência do reconhecimento de um estímulo nocivo ou pela ação de outros mediadores inflamatórios, nomeadamente de proteínas do complemento C5a, que promove a libertação do ácido araquidónico daqueles componentes da membrana. O ácido araquidónico livre é então metabolizado segundo duas vias enzimáticas principais, a via da COX e a da LOX (Figura 1.5)¹⁶⁸. A COX promove a síntese de PG e de TX e a LOX gera LT e LX. As PGE₂, PGD₂, PGF_{2w}, PGI₂ e o TXA₂, resultam da via da COX, por uma ação de uma enzima específica ou de um intermediário¹⁶⁸. A COX, compreende duas formas isoméricas, a COX-1 e a COX-2. O reconhecimento de um estímulo inflamatório

INTRODUÇÃO

desencadeia a expressão de ambas as COX. No entanto, ao contrário da COX-2 que está presente na inflamação mas não é produzida na maioria dos tecidos normais, a COX-1 é amplamente expressa nos tecidos sãos, contribuindo para a função homeostática através da produção de PG¹¹⁷. Estas diferenças têm muito sido investigadas através do desenvolvimento de inibidores da COX-2, visando a inibição de inflamação prejudicial ao organismo, sem bloquear os efeitos protetores das prostaglandinas produzidas nas células¹¹⁷. Constatou-se que essas diferenças não são absolutas e que os inibidores da COX-2 podem aumentar o risco da ocorrência de problemas cardiovasculares ou cerebrovasculares, possivelmente porque embora prejudiquem a produção de PGI₂, uma inibidora da agregação plaquetária, não afetam a produção induzida pela COX-1, de um mediador da agregação nas plaquetas, o TXA₂¹¹⁷. Os glucocorticóides são igualmente fármacos anti-inflamatórios que intervêm na produção de eicosanóides do ácido araquidônico, inibindo ativamente a fosfolipase A₂ e, por consequência impedindo a liberação do ácido araquidônico dos lípidos da membrana¹¹⁷.

Os mediadores inflamatórios derivados do ácido araquidônico estão envolvidos na modulação da intensidade e duração da resposta inflamatória. Alguns destes eicosanóides apresentam vários efeitos pró-inflamatórios, amplamente estudados, nomeadamente a PGE₂ e os LT da série 4 (LTA₄, LTC₄, LTD₄, LTE₄)¹⁶⁸ (Tabela 1.8). No entanto, evidências científicas têm demonstrado que alguns destes eicosanóides exibem ambos os efeitos pró e anti-inflamatórios. Estudos científicos evidenciaram que a PGE₂ é um potente inibidor da produção das citocinas pró-inflamatórias IL-1 e TNF- α por monócitos e macrófagos¹⁹⁵ e, mais recentemente foi possível demonstrar-se que aquela prostaglandina inibe a 5-LOX, promovendo deste modo a produção de LT da série 4, e induz a 15-LOX de modo promover a formação de LP que apresentam efeitos anti-inflamatórios^{183,196}. Segundo Calder¹⁶⁸ poderá existir uma variação temporal no papel de PGE₂, assumindo inicialmente um papel pró-inflamatório, seguido por uma intervenção na resolução de inflamação, através da inibição de 5-LOX e a indução da produção de LX.

Na Tabela 1.8 reuniram-se alguns dos efeitos anti-inflamatórios imputados a eicosanóides derivados dos lípidos. As LX compreendem uma família de eicosanóides derivados do AA, potentes anti-inflamatórios que são gerados em fases tardias da inflamação¹⁹⁷. Dada a curta duração das LX têm sido desenvolvidos estudos com compostos de síntese análogos destes eicosanóides derivados dos lípidos. Análogos da LXA₄ testados

INTRODUÇÃO

em modelos animais de várias patologias, nomeadamente na fibrose, lesão de reperfusão e aterosclerose, demonstraram ter um potencial terapêutico através do seu efeito anti-inflamatório^{197,198}.

Tabela 1.8 Efeitos pró-inflamatórios da PGE₂ e de leucotrienos da série 4 (LTA₄, LTC₄, LTD₄, LTE₄)

PGE ₂	LTB ₄	LTC ₄ , LTD ₄ , LTE ₄
INDUZ FEBRE CAUSA DOR AUMENTA A PERMEABILIDADE VASCULAR PROMOVE VASODILATAÇÃO AUMENTA A DOR CAUSADA POR OUTROS AGENTES AUMENTA A PRODUÇÃO DA IL-6	AUMENTA A PERMEABILIDADE VASCULAR AUMENTA O FLUXO SANGUÍNEO LOCAL AGENTE QUIMIOTÁTICO PARA LEUCÓCITOS AUMENTA A LIBERTAÇÃO DE ENZIMAS LISOSSOMAIS INDUZ A LIBERTAÇÃO DE ROS PELOS GRANULÓCITOS AUMENTA A PRODUÇÃO DE IL-1, IL-6 E TNF-α	AUMENTA A PERMEABILIDADE VASCULAR AUMENTA A SECREÇÃO DE MUCO AUMENTA A HIPERSENSIBILIDADE PROMOVE BRONCOCONSTRIÇÃO

(Adaptado de Calder *et al.*¹⁶⁷)

(da esquerda para a direita) IL, interleucina; PG – prostaglandina; LT – leucotrieno; ROS, espécies reativas de oxigénio; TNF-α, Fator de necrose tumoral-α.

Tabela 1.9 Efeitos anti-inflamatórios da PGE₂, das lipoxinas e das prostaglandinas ciclopentonoênicas

PGE ₂ ^{168,144}	LX ¹⁶²	Cy-PG ¹⁶⁹
- PROMOVE A DIMINUIÇÃO DA PRODUÇÃO DE IL-1β E DE TNF-α POR MONÓCITOS E POR MACRÓFAGOS - INIBE A 5-LOX E, CONSEQUENTEMENTE, A PRODUÇÃO DE LT DA SÉRIE 4 - INDUZ A PRODUÇÃO DA 15-LOX PROMOVENDO A PRODUÇÃO DE LX	- PROMOVEM A FAGOCITOSE DE NEUTRÓFILOS APOPTÓTICOS - AUMENTAM A FAGOCITOSE DE NEUTRÓFILOS APOPTÓTICOS - DIMINUEM A MIGRAÇÃO DE NEUTRÓFILOS E DE EOSINÓFILOS - DIMINUEM A EXPRESSÃO GENÉTICA E A ATIVAÇÃO DE MOLÉCULAS DE ADEÇÃO - PROMOVEM A ADEÇÃO DE MONÓCITOS E QUIMIOTAXIA - INIBEM A PRODUÇÃO DA IL-8 PELAS CÉLULAS EPITELIAIS - DIMINUEM A PRODUÇÃO DE SUPERÓXIDO POR NEUTRÓFILOS	- DIMINUEM A EXPRESSÃO DA VCAM1 DE ADEÇÃO INTERCELULAR NO ENDOTÉLIO - DIMINUEM A MIGRAÇÃO DE MONÓCITOS - DIMINUEM A EXPRESSÃO DE INOS POR MACRÓFAGOS - AUMENTAM A APOPTOSE DE CÉLULAS MIELÓIDES - DIMINUEM A ATIVAÇÃO DO NF-KB

(da esquerda para a direita) IL, interleucina; TNF-α, Fator de necrose tumoral alfa; 5-LOX, 5-lipoxigenase; LT, leucotrieno; LX, lipoxinas; Cy-PG, prostaglandinas ciclopentonoênicas; VCAM1, molécula de adesão celular vascular 1; NF-kB, Fator de transcrição nuclear kB.

INTRODUÇÃO

Para além das LX, outros eicosanóides derivados do AA assumem funções anti-inflamatórias. Segundo Lawrence *et al.*¹⁶⁹ a via da COX-2 gera outros metabolitos que participam na resolução da inflamação – as Cy-PG. Estes metabolitos são eicosanóides eletrofílicos gerados por desidratação espontânea de outras PG¹⁹⁹ (Figura 1.6). A Cy-PG 15deoxi Δ 12, 14PGJ₂ (15dPGJ₂) é produzida a partir da PGD₂ e foi identificada como sendo um ligando endógeno dos fatores de transcrição do Recetor do Perissoma Proliferador Ativado, que assumem um papel importante na regulação do metabolismo dos lípidos e da resposta imunitária¹⁹⁹. Estudos realizados em modelos experimentais têm demonstrado efeitos protetores desta Cy-PG na AR induzida e na lesão de isquémia-reperfusão, entre outros modelos¹⁹⁹. Adicionalmente, investigações em modelos experimentais de inflamação evidenciaram outros efeitos biológicos benéficos de Cy-PG, incluindo a inibição de factor de transcrição NF-kB e a indução de vários genes pró-inflamatórias, nomeadamente iNOS, COX-2, e ICAM-1¹⁹⁹. Contrariamente ao afirmado inicialmente¹⁹⁹ muitas destas PG são produzidas in vivo em concentrações capazes de suportarem a sua atividade anti-inflamatória¹⁹⁴.

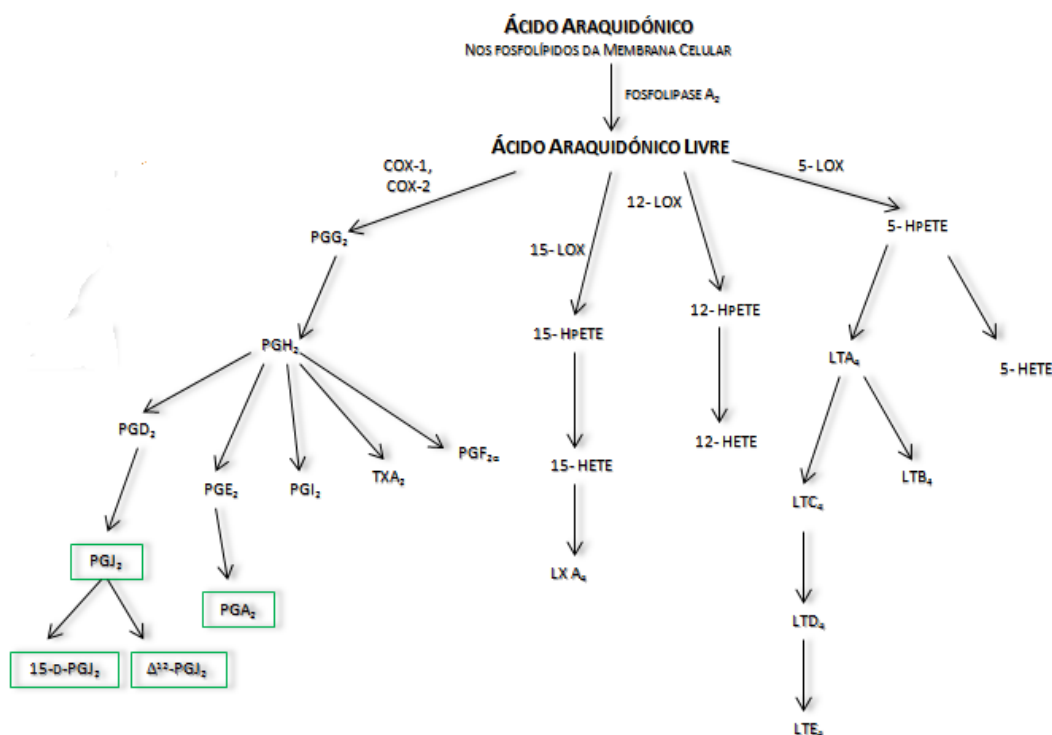


Figura 1.6 - Esquema da via de síntese dos eicosanóides a partir do ácido araquidónico.

(Adaptado de Calder *et al.*¹⁶⁸; Díez-Dacal *et al.*¹⁹⁴)

(da esquerda para a direita) COX, cicloxigenase; PG, prostaglandina; TX, tromboxano; LOX, lipoxigenase; HETE, ácido hidroxieicosatetraenóico; HpETE, ácido hidroperoxieicosatetraenóico; LX A₄, lipoxina A₄; LT, leucotrienos. A desidratação não enzimática de algumas PG gera a formação de prostaglandinas ciclopentonônicas (Cy-PG) (PG nos retângulos a verde).

INTRODUÇÃO

Estudos recentes evidenciaram que a ingestão de doses diárias elevadas dos ácidos gordos ômega 3 docohexaenóico (DHA) e eicosapentaenóico (EPA) (miligramas a gramas) possibilita a biossíntese de duas famílias de mediadores lipídicos anti-inflamatórios: protetinas e resolvinas^{183,195,200}. Estes mediadores lipídicos são induzidos na fase de resolução da inflamação: as protetinas derivam do DHA e as resolvinas podem sintetizadas a partir de ambos DHA e EPA da dieta¹⁶⁸. Esta descoberta assume grande interesse e constitui um incentivo considerável à investigação de efeitos anti-inflamatórios resultantes da administração de outros alimentos, nomeadamente de frutos de *Rubus idaeus* L..

O fator de ativação das plaquetas é igualmente um potente mediador inflamatório derivado dos fosfolípidos da membrana de células endoteliais, plaquetas, neutrófilos, monócitos, macrófagos, entre outras, por ação da fosfolipase A₂^{201,202}. Este mediador inflamatório promove a agregação das plaquetas, provoca a desgranulação destas e assume diversos outros efeitos inflamatórios, via ligação a recetores específicos, nomeadamente indução da produção citocinas (p.ex. IL-1) e de eicosanóides de lípidos (p.ex. LT) e a participação na adesão e na quimiotaxia de leucócitos^{177,201}.

O resultado de uma reação inflamatória depende sobretudo da regulação coordenada de uma variedade de importantes mediadores inflamatórios – as citocinas (Tabela 1.10). As citocinas (do Grego *cyto*, célula e *kinos*, movimento) compreendem um grupo heterogéneo de péptidos e de proteínas solúveis de baixo peso molecular, algumas das quais glicoproteínas, sintetizadas e libertadas a partir de várias células envolvidas em respostas imunitárias, nomeadamente de células imunitárias e endoteliais, que, atuam em concentrações da ordem dos pM - nM, ativam recetores específicos e modulam várias funções em diversas células e tecidos¹⁷⁶. Estes mensageiros celulares têm uma vida curta, são frequentemente produzidos em cascata (uma citocina estimula as células-alvo para as citocinas adicionais) e podem atuar em sinergia ou antagonismo¹⁷⁶. Uma dada citocina pode ser produzida em diferentes tipos de células e promover diversos efeitos biológicos, dependendo do tipo de célula, do tempo, e do contexto, ou seja, funções semelhantes podem ser estimuladas por citocinas distintas¹⁷⁶.

As citocinas podem ser agrupadas em famílias ou categorias (Tabela 1.10) e classificar-se de pró-inflamatórias e de anti-inflamatórias. No entanto, uma distinção clara

INTRODUÇÃO

das citocinas em pró e anti-inflamatórias nem sempre é possível pois a resposta inflamatória pode ser determinada não só pelo equilíbrio entre citocinas pró- e anti-inflamatórias, mas também pela distribuição da libertação destes mediadores inflamatórios, ambiente local no qual eles são libertados, presença de fatores de sinergia ou de competição, densidade de recetores de citocinas e capacidade de resposta dos tecidos para cada citocina¹⁷⁶. Embora o número e funções das citocinas sejam diversos, a maioria destes mediadores inflamatórios partilha mecanismos comuns de ação. Muitos destes mensageiros químicos são sintetizados numa forma inativa, ativada seguidamente por ação de uma enzima; interagem com recetores específicos em células alvo e induzem a ativação das proteínas cinases associadas com os domínios citoplasmáticos dos recetores de citocinas, por fosforilação; em última análise, as vias intracelulares de transdução de sinal de citocinas, ativam fatores de transcrição como transdutores e ativadores de transcrição de sinal, nomeadamente o NF- κ B¹⁷⁶

Tabela 1.10 Principais famílias de citocinas

CATEGORIA (abreviatura)	CARACTERÍSTICAS ¹⁷⁶
Fatores de necrose tumoral (TNF)	Citocinas ativadoras de apoptose. Compreende vários membros nomeadamente as TNF- α e TNF- β .
Interleucinas (IL)	Citocinas envolvidas na mediação de sinais entre leucócitos. Compreendem diversas subfamílias nomeadamente as IL-1 e IL-10.
Interferons (IFN)	Citocinas envolvidas em respostas antivirais. Incluem os IFN- α, β, γ .
Quimiocinas (CX, CC, CXC e CX3C)	Compreendem 4 subfamílias de citocinas envolvidas em quimiotaxia (consoante a presença de um resíduo de cisteína conservado no NH ₂ terminal e as características da região X variável). As suas principais funções são o recrutamento de leucócitos para o local inflamado e o controlo da organização anatómica normal das células nos tecidos linfóides e outros. As CX atraem linfócitos; as CC recrutam principalmente células mononucleares; as CXC são quimioatratantes com propriedades angiogénicas ou angiostáticas; as CX3C incluem a CX3CL1 (fratalcina).
Linfocinas	Citocinas produzidas sobretudo por linfócitos. Inclui o interferon- γ (INF- γ), uma linfocina que assume um papel importante na inflamação crónica.
Monocinas	Citocinas produzidas principalmente por monócitos
Fatores Estimulantes de Colónias (CSF)	Citocinas que suportam o crescimento de células em meios semi-sólidos. Incluem granulócitos (G) G-CSF, monócitos (M) M-CSF e granulócitos e monócitos de GM-CSF.
Fatores de Crescimento Transformantes (TGF)	Citocinas envolvidas no crescimento ou na transformação de células. Incluem as TGF- β 1,2 e 3, as proteínas morfogenéticas do osso (BMP), as ativinas e as inibinas.

INTRODUÇÃO

Tabela 1.11 Algumas características de citocinas relevantes na inflamação aguda e crónica

CITOCINA (REFERÊNCIAS)	CÉLULAS PRODUTORAS	ALVOS/RECETORES	FUNÇÕES BIOLÓGICAS
TNF-α (176,190,203)	Células imunitárias (macrófagos ativados e mastócitos), adipócitos, células epiteliais, endoteliais e musculares	Diversas células e órgãos, nomeadamente leucócitos, adipócitos, hipotálamo, e células musculares/ TNFR1 e TNFR2	Febre, promove ativação do NF-kB e a síntese de proteínas de fase aguda, nomeadamente a expressão de moléculas de adesão nas células endoteliais, aumenta a trombogenicidade do endotélio, estimula a diferenciação de células Th, promove caquexia e apoptose, inibe a replicação viral, atividade antitumoral, está envolvida na inflamação sistémica.
IL-1β (176,190)	Células imunitárias	Várias, sobretudo leucócitos/ IL-1R1 e IL-1R2	Febre, recrutamento e ativação de neutrófilos, a libertação de aminoácidos pelo músculo, produção de colagénio pelos fibroblastos, ativação de linfócitos B e T, estimula a síntese de proteínas de fase aguda, nomeadamente a expressão de moléculas de adesão nas células endoteliais
IL-6 (176,190)	Células do sistema imunológico, endoteliais, epiteliais, musculares e ósseas.	Hepatócitos e leucócitos (células β ativadas) /IL-6R α e IL-6R β	Febre, promove a síntese de proteínas de fase aguda, a libertação de aminoácidos pelo músculo, a libertação de ácidos gordos a partir de tecido adiposo, de a ativação de neutrófilos e de linfócitos, a inibição das citocinas TNF e IL-1 e a ativação da IL-1ra
IL-8 (CXCL8) (176,190)	Células imunitárias, epiteliais e endoteliais	Neutrófilos, mastócitos, monócitos, queratinócitos e células endoteliais/CXCR1 e CXCR2	Recrutamento e ativação de neutrófilos e de basófilos ao local inflamado, propriedades angiogénicas e promove a síntese de proteínas de fase aguda
IL-10 (176,190,204)	Células imunitárias	Macrófagos, Linfócitos B e T /IL-10R1 combinado com o IL-10R2	Diminui a expressão de citocinas pró-inflamatórias; reduz a geração de células Th17 e da MHC de classe II; co-estimula a expressão molecular de células apresentadoras de antígenos; melhora a sobrevivência de células B e a produção de anticorpos
ITF-α,β,γ (176,190,205)	Células epiteliais e imunitárias	Várias células /IFN α R1, IFN α R2; IFN β R; ITF- γ 1 e ITF- γ 2	Ativação de células NK e de macrófagos; estímulo da expressão de MHC I e II em células que apresentam antígenos; promoção da diferenciação de Th1; supressão da diferenciação de Th2; inibição da replicação viral
IL-12 (176,190)	Células imunitárias	Leucócitos (células T e NK) /Heterodímero de IL-12R β 1 e de IL-12R β 2	Funções pro-Th1 e anti-Th2; promove a proliferação de Th1 e de células NK, a estimulação da atividade citotóxica de células T e NK, a sobre-regulação de IL-18R e a ativação de macrófagos; propriedades anti-angiogénicas

(da esquerda para a direita) TNF, fator de necrose tumoral; IL, interleucina; ITN, interferon; R, recetor (p.ex. TNFR1, Fator de necrose tumoral recetor 1); NK, *natural killer*; Th, T auxiliar; MHC, complexo de histocompatibilidade maior.

INTRODUÇÃO

As citocinas que assumem um papel de destaque nas respostas inflamatórias agudas são o TNF- α , as IL-1 α e IL-6 e a IL-8. As citocinas ITF- γ e IL-12 desempenham um papel mais importante na inflamação crónica^{172,176}. As características mais relevantes destas importantes citocinas apresentam-se na Tabela 1.11.

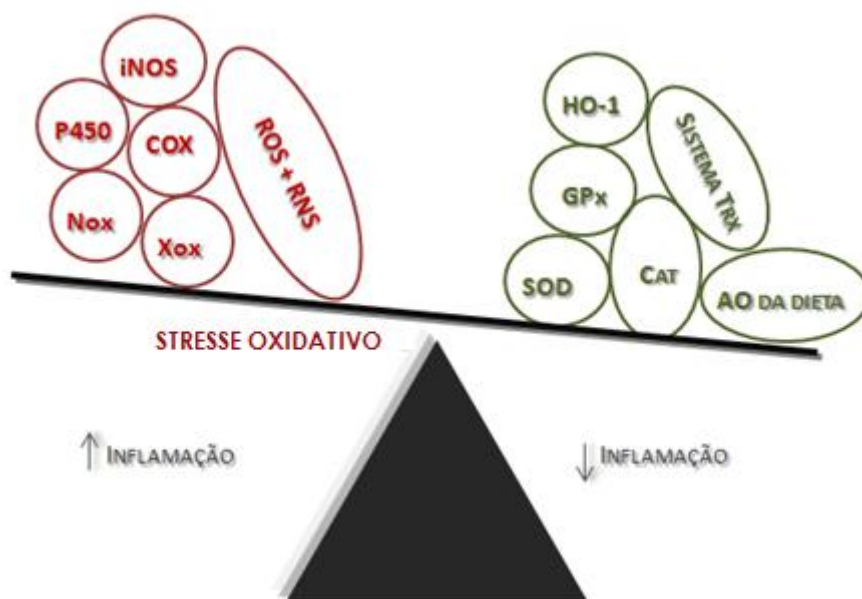


Figura 1.7 - Stresse oxidativo e inflamação.
(Adaptado de Hsieh *et al.*²⁰⁶; Yoshihara *et al.*²⁰⁷)

(da esquerda para a direita) Nox, NADPH oxidase; Xox, xantina oxidase; P450, enzima do citocromo p450; COX, cicloxigenase; iNOS, sintase induzida do monóxido de azoto; ROS, espécies reativas de oxigénio; RNS - espécies reativas de azoto; SOD, superóxido dismutase; GPx, glutathione peroxidase; HO-1, heme oxigenase-1; CAT, catalase; Trx, tioredoxina; AO, antioxidantes.

É consensual que o stresse oxidativo, pode desencadear inflamação e que as ambas as respostas inflamatórias agudas e crónicas geram uma produção excessiva de ROS e RNS^{110,157}. A coexistência de ambos (stresse oxidativo e inflamação) perpetua o estado inflamatório. O stresse oxidativo resulta do desequilíbrio, num dado momento, entre a produção de ROS e RNS e o efeito protetor do sistema antioxidante que neutraliza e remove aqueles radicais do organismo (Figura 1.7)²⁰⁶. Em condições de stresse oxidativo excessivo, elevadas concentrações de radicais livres em células e tecidos, podem provocar danos em macromoléculas biológicas, sobretudo em lípidos membranares, proteínas, nomeadamente lipoproteínas, e ácidos nucleicos, contribuindo para o desenvolvimento de patologias tais como cancro, doenças autoimunes e diabetes *mellitus*^{157,207}.

INTRODUÇÃO

No organismo os radicais livres são gerados naturalmente em todas as células, em baixas concentrações, nomeadamente nas reações de oxidação-redução (*redox*) que ocorrem durante a respiração mitocondrial e a geração de energia, podem ser absorvidos, p.ex. por exposição a radiações UV ou a raios X, provêm de alimentos ou resultam de situações patológicas²⁰⁸. Muitas das espécies geradas no organismo saudável são inativadas por diversos mecanismos enzimáticos, incluindo a ação das SOD (catalisam a dismutação do anião superóxido, O_2^- , em O_2 e H_2O_2), GPx (promovem a remoção do H_2O_2), CAT (converte o H_2O_2 em água e oxigénio), HO-1 e do sistema da Trx, e não enzimáticos, resultado da intervenção de antioxidantes endógenos ou exógenos como as vitaminas E, A e C (efetiva na captação de diversas espécies oxidantes), outras decaem espontaneamente, e outras ainda intervêm em vias de sinalização celular em diversas reações fisiológicas²⁰⁸.

RS adicionais são produzidos no organismo com alguma disfunção biológica, nomeadamente na inflamação²⁰⁸. Leucócitos, principalmente neutrófilos e macrófagos, geram ROS em fagossomas e fagolisossomas, pela via da Nox, incluindo os radicais OH^\bullet , 1O_2 , O_2^- e o NO^\bullet e o não radical H_2O_2 , por um processo designado de *oxidative burst*^{110,157}. No organismo inflamado gera-se stresse oxidativo e, resultado da ação das enzimas Nox e Xox, do P450, e sobretudo das COX e iNOS (catalisa a síntese de NO, a partir da L-arginina, O_2 e NADPH; a sua expressão é induzida sobretudo pelas citocinas IL-1, TNF- α e IFN- γ e pela endotoxina bacteriana), libertam-se de mediadores inflamatórios, designadamente PGE_2 , e espécies reativas em excesso, incluindo o NO, um agente citotóxico extremamente reativo na presença de radicais livres, amplificam-se os efeitos pró-inflamatórios e criam-se condições para a ocorrência de lesões celulares, tais como peroxidação lipídica das membranas, danos em proteínas e no DNA²⁰⁶. No entanto, como referido anteriormente, a intervenção de antioxidantes endógenos e exógenos, nomeadamente de antioxidantes naturais da dieta, como polifenóis, pode reduzir os radicais livres libertados e atenuar a resposta inflamatória.

Os mediadores inflamatórios plasmáticos incluem as proteínas circulantes do sistema de complemento, mais de 30 proteínas presentes no plasma ou ligadas a membranas²⁰⁹. O sistema de complemento é um dos principais mecanismos que possibilita o reconhecimento dos patogénios e uma defesa do hospedeiro efetiva contra a infeção inicial²¹⁰. Estas proteínas do plasma, numeradas de C1 a C9, nomeadamente as C3a, C3b e sobretudo as C5a e C5b,

INTRODUÇÃO

assumem igualmente um papel relevante na inflamação. Uma vez ativados, diretamente pelo microrganismo invasor ou indiretamente pelo anticorpo ligado a este, os componentes ativos opsonizam os agentes invasores, facilitando a sua fagocitose e destruição por macrófagos e neutrófilos, aumentam a permeabilidade vascular e provocam vasodilatação, induzindo a libertação de histamina pelos mastócitos, ativam leucócitos, aumentam a sua adesão às células endoteliais e constituem potentes agentes quimiotáticos para neutrófilos, monócitos, eosinófilos e basófilos, entre outras funções^{172,210}. A ativação das proteínas do sistema completo é regulada por diversos mecanismos de modo a prevenir-se uma ativação descontrolada das mesmas^{209,210}.

O NF- κ B desempenha um papel chave na resposta inflamatória, induzindo a transcrição de múltiplos mediadores pró-inflamatórios, nomeadamente a expressão de citocinas (p.ex. das IL-1, IL-6 e TNF- α), quimiocinas, moléculas de adesão, das enzimas iNOS e COX-2, de fatores de crescimento e de inibidores de apoptose^{3,199,211}. A via de ativação do NF- κ B tem sido objeto de diversas investigações científicas visando o desenvolvimento de fármacos anti-inflamatórios. Esta via metabólica envolve a estimulação e um complexo com a atividade da cinase, IKK, que fosforila a subunidade inibidora do NF- κ B, I κ B, desencadeando a ubiquitinação e degradação da I κ B proteossómica, que promove a acumulação nuclear do dímero ativo, representada por p65/p50, e ativa a transcrição de genes alvo¹⁴⁹.

Os neutrófilos são células efetoras do sistema imunitário inato, fagocitárias, dotadas de plasticidade, que assumem um papel muito relevante nas respostas inflamatórias, aguda e crónica e na exacerbação ou resolução de diversas patologias, incluindo infeções, doenças autoimunes, como a artrite reumatóide e a aterosclerose, e cancro^{212,213}. Em condições homeostáticas, os neutrófilos são os leucócitos mais abundantes na corrente sanguínea. Na inflamação aguda, estas são as primeiras células imunitárias a intervir no local inflamado, em resposta à libertação, durante a lesão tecidular, de fatores de quimiotaxia para estas células, nomeadamente a IL-8, o componente do complemento C5a e o LTB₄¹⁷⁸. Os neutrófilos utilizam diversas armas microbicidas, independentes e dependentes do oxigénio, para destruir e remover os agentes infecciosos²¹⁴. Os mecanismos dependentes de oxigénio envolvem a produção de ROS²¹⁴. No local da inflamação, os neutrófilos ativados atuam como células fagocitárias e, como referido anteriormente, libertam fatores citotóxicos,

INTRODUÇÃO

nomeadamente ROS, incluindo o O_2^- , produzidos pelos fagócitos através da ativação do sistema enzimático Nox, e outros compostos derivados do metabolismo do O_2^- , tais como H_2O_2 e OH^{\bullet} ^{178,212,214}. Embora essenciais para a atividade antimicrobiana dos neutrófilos, as ROS libertadas podem induzir danos nos tecidos sãos do hospedeiro e estimular a secreção de $TNF-\alpha$ ¹⁷⁸. O $TNF-\alpha$, é uma proteína primária de fase aguda e um mediador chave na resposta inflamatória que pode ser produzido por vários tipos de células do ambiente tecidual, atuando de modo autócrino e parácrino na regulação das células do sistema inato numa situação de inflamação¹⁷⁸. Esta citocina inicia a resposta inflamatória e a persistência da sua expressão poderá impedir a resolução da inflamação e conduzir ao desenvolvimento de estados inflamatórios crónicos¹⁷⁸. É hoje aceite que os neutrófilos participam na patogénese de doenças autoimunes, embora a natureza do seu contributo ainda não esteja bem definida²¹³. Estes leucócitos estão envolvidos no desenvolvimento e na manutenção de AR^{178,213}. A população de neutrófilos apresenta-se aumentada na sinóvia de doentes com AR e, em articulações inflamadas envolvendo a ativação da Nox, estas células sofrem *oxidative burst* libertando quantidades massivas de O_2^- , normalmente usado para matar organismos invasores, entre outras ROS, implicando os neutrófilos na patogénese da destruição da articulação¹⁷⁸.

A modulação do *oxidative burst* dos neutrófilos pode revelar-se útil na prevenir ou minimizar os efeitos nefastos de processos inflamatórios não controlados ou sustentados²¹⁵. A produção de ROS e de RNS por neutrófilos pode ser avaliada *in vitro* por diversos métodos de deteção, nomeadamente através de técnicas de fluorescência e quimioluminescência^{215,216}. Estudos *ex vivo* realizados em neutrófilos humanos com derivados da pirazolona e com paracetamol evidenciaram a inibição do *oxidative burst* nestas células e o resgate de ROS libertados^{214,217}. Recentemente, a mesma equipa de investigadores da Universidade do Porto estudou a modulação do *oxidative burst* em neutrófilos humanos por diversos flavonóides, nomeadamente a quercetina, um flavonol presente nos frutos de *Rubus idaeus* L.²¹⁵. Os flavonóides estudados nos neutrófilos humanos foram estimulados com forbol-12-miristato-13-acetato, e na avaliação das ROS libertadas foram usadas técnicas de fluorescência e de quimioluminescência²¹⁵. Segundo Ribeiro *et al.*²¹⁵ todos os flavonóides testados evidenciaram capacidade de modular o *oxidative burst* dos neutrófilos, resultado sobretudo do grupo catecol dos anéis B. Estes resultados instigam

INTRODUÇÃO

a continuação da investigação de efeitos anti-inflamatórios de compostos fenólicos e de extratos ricos nestes fitoquímicos.

Os modelos experimentais de inflamação foram desenvolvidos para melhorar o conhecimento de doenças humanas e suportar a investigação de fármacos anti-inflamatórios²¹⁸. O estudo dos efeitos de constituintes, extratos ou alimentos na redução da inflamação pode ser realizado em modelos experimentais de inflamação local, nomeadamente no modelo do edema da pata do rato induzido pela carragenina, em modelos de inflamação sistémica, p. ex. nos modelos do choque séptico induzido pelo LPS e de isquémia-reperfusão de órgãos como coração, fígado, pulmão ou rim, e em modelos de inflamação crónica, designadamente nos modelos da artrite reumatóide ou da colite, entre outros^{218,219}.

A λ -carragenina é um polissacárido complexo de monómeros de galactose, injetável, que induz inflamação aguda de modo reprodutível. O modelo do edema da pata induzido pela carragenina em ratos e murganhos é um modelo experimental de inflamação aguda muito usado na investigação de propriedades anti-inflamatórias de fármacos anti-inflamatórios não esteroides que inibem a produção de PG^{218,220}. A λ -carragenina é introduzida no animal por injeção subcutânea, induzindo imediatamente uma resposta inflamatória aguda que se traduz na formação local de edema, hiperalgia e eritema, resultado da ação dos mediadores inflamatórios, nomeadamente bradicinina, histamina, proteínas do complemento, ROS e RNS²²¹. Regra geral, a resposta inflamatória é quantificada pelo aumento do tamanho da pata (edema) que atinge o seu máximo cerca de 5h após a injeção²²¹. Este modelo também é muito utilizado no estudo de efeitos anti-inflamatórios de alimentos, de extratos e de constituintes alimentares^{222,223}. Os alimentos/constituintes em estudo são avaliados pela sua capacidade para reduzir/prevenir o edema na pata induzido pela λ -carragenina^{222,224}.

AR é uma doença crónica autoimune sistémica, poliarticular, que se caracteriza por uma sinovite persistente, hiperplasia sinovial com infiltração de células inflamatórias, presença de auto-anticorpos, nomeadamente dos fatores reumatóides e de péptidos citrulinados, destruição progressiva da cartilagem e do osso^{225,226,227}. Tendo sido considerada uma síndrome de causa desconhecida, assiste-se hoje à emergência de subconjuntos distintos

INTRODUÇÃO

da doença, nomeadamente AR fator reumatóide positivo e negativo e, mais recentemente, com anticorpos para o antígeno de péptidos citrulinados presentes ou ausentes^{226,228}. A incidência e prevalência desta doença nas populações varia consideravelmente entre áreas geográficas e ao longo do tempo, resultado de fatores genéticos, ambientais e da interação genes-meio ambiente²²⁹. A maioria dos estudos realizados em países europeus e da América do Norte estimam uma prevalência de AR de 0,5-1% e uma incidência anual média de 0,02-0,05%^{230,231}. Regra geral, a AR tem maior prevalência de doentes do sexo feminino²³²⁻²³⁴. Entre 2010 e 2015 foi desenvolvido em todo o território nacional, um estudo epidemiológico conduzido pela Sociedade Portuguesa de Reumatologia, designado de EpiReumaPT, para estudar a incidência, prevalência e impacto de doenças reumáticas e músculo-esqueléticas em todo o território nacional, continente e ilhas da Madeira e Açores²³¹. De acordo com o EpiReumaPT a prevalência de AR em Portugal está dentro dos valores referidos para outros países europeus e da América do Norte: 0,7% da amostra estudada (n=3.877 adultos), com uma prevalência de 1,2% nas mulheres e de apenas 0,3% nos homens²³⁵. O número estimado de portugueses com esta patologia é 63.198, dos quais 53.188 mulheres são mulheres²³⁵. A AR está associada a crises de inflamação e à progressiva erosão das articulações conduzindo, com frequência, a perda de funcionalidade, morbilidade grave e mortalidade prematura²³⁶. As deformações nas articulações sinoviais, nomeadamente das pequenas articulações das mãos e dos pulsos, de forma simétrica, conduzem a uma limitação dos movimentos. No primeiro ano do início da doença cerca de 70% dos doentes sofrem destruição articular irreversível e aproximadamente 80% dos adultos, em idade ativa, experimentam dor incapacitante, rigidez e redução de capacidade funcional, com custos elevados para os indivíduos e para a sociedade²³⁶. A AR tornou-se, dada a sua evolução, num protótipo para o conhecimento da patogénese molecular visando o desenvolvimento de novos tratamentos²²⁶. O crescente conhecimento de fatores de risco tem exigido a implementação de estratégias preventivas²²⁶. Segundo Klareskog *et al.*²²⁶, o tratamento precoce desta doença pode prevenir esta deficiência em muitos doentes, no entanto a administração de novos fármacos, mais eficazes, a todos os quantos poderiam beneficiar deste tratamento pode ser uma abordagem muito dispendiosa. Neste âmbito e dada a conjuntura económica de crise, a investigação de efeitos antiartríticos em alimentos, constituintes alimentares e/ou extratos destes afigura-se muito interessante.

INTRODUÇÃO

A AR também é uma doença inflamatória crônica, destrutiva, que envolve diversas citocinas que atuam em série e em paralelo²²⁸. A expressão clínica desta patologia é sistêmica - fadiga, febre, anemia, vasos e envolvimento de órgãos - e local, sendo a destruição da articulação imputável, em certa medida ao processo inflamatório, a manifestação mais devastadora²²⁸. A inflamação da membrana sinovial é um elemento chave na AR. Estádios crônicos desta patologia conduzem à formação irreversível de *pannus* (Figura 1.8), um achado histológico único da AR que resulta da hiperplasia da sinóvia^{237,238}. Esta estrutura anormal resulta da infiltração de um grande número de células inflamatórias, incluindo células T e B ativadas e macrófagos, e de um aumento do número de fibroblastos sinoviais ativados, considerados os principais intervenientes na patogénese da AR^{227,237,239}.

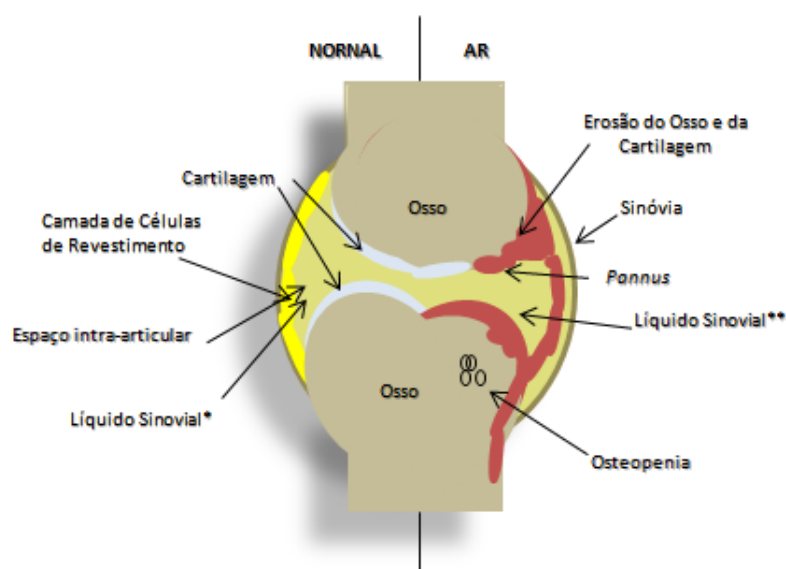


Figura 1.8 - Representação esquemática de uma articulação normal e artrítica.
(Adaptado de Ibold *et al.*²³⁷)

(da esquerda para a direita) *Líquido sinovial em quantidade normal; **Líquido sinovial em quantidade aumentada.

Numa fase inicial da inflamação da sinóvia ocorre migração celular, ativada pelas células endoteliais da microvasculatura sinovial, aumentando a expressão de moléculas de adesão (incluindo integrinas, seletinas, e membros da superfamília da imunoglobulina) e de quimiocinas²⁴⁰. Neoangiogénese local, induzida em condições hipóxicas e por ação de citocinas, e linfangiogénese insuficiente, que limita a saída celular, são aspetos característicos da sinovite precoce e estabelecida²⁴⁰. Estudos *in vitro* e *in vivo* têm evidenciado que as células T e os fibroblastos sinoviais podem ativar-se um ao outro, o que é crucial para o progresso da doença²²⁷. A formação do *pannus* estimula a libertação de

INTRODUÇÃO

mediadores pró-inflamatórios, nomeadamente das citocinas TNF- α , IL-1 e IL-6, do fator de ativação das plaquetas, de PG, e da substância P por macrófagos, conduzindo à destruição da cartilagem e à erosão do osso²³⁹. Os fibroblastos sinoviais e os mastócitos expressam altos níveis de enzimas proteolíticas, que também promovem a lesão da cartilagem e erosão das articulações²³⁸.

A inflamação que caracteriza a AR é atribuída a uma predominância dos efeitos de citocinas pró-inflamatórias (sobretudo TNF- α , IL-1 e IL-6) relativamente aos das citocinas anti-inflamatórias²²⁸. A influência pró-inflamatória do TNF- α na AR relaciona-se com a ativação de leucócitos, células endoteliais e fibroblastos sinoviais, com a indução da produção de outras citocinas pró-inflamatórias, nomeadamente interleucinas, quimiocinas e moléculas de adesão, a indução da produção de enzimas da matriz, e de ROS, com a ativação de modulação das células Tregs, ativação de osteoclastos e, consequentemente, reabsorção de osso e cartilagem e osteopenia no osso, e com a mediação da disfunção cognitiva metabólica^{228,240}. As células Tregs sustentam um dos principais mecanismos de auto-tolerância, suprimindo respostas imunitárias patológicas contra auto-antígenos, constituem atualmente um grande foco de estudo na AR e noutras doenças autoimunes²⁴¹. As citocinas da família da IL-1 (IL-1 α , IL-1 β , IL-18, IL-33), nomeadamente as citocinas IL-1 α e IL-1 β , promovem a ativação de leucócitos, células endoteliais, fibroblastos sinoviais osteoclastos e de condrócitos, induzem a produção enzimas da matriz pelos condrócitos, e intervêm na mediação de febre, no metabolismo da glucose, induzindo um aumento do mesmo, e na redução da função cognitiva^{228,240}. Na AR as citocinas TNF- α , IL-1 e IL-17 atuam sinergicamente para libertar metaloproteases da matriz (MMPs), a partir de fibroblastos e de macrófagos, nomeadamente as MMP-1 e MMP-3 que são capazes de degradar todas as proteínas estruturais importantes da matriz extracelular da cartilagem²²⁶. A IL-6 induz a ativação de leucócitos sinoviais locais e osteoclastos, participa na diferenciação de linfócitos B e a produção de anticorpos, intervêm em algumas manifestações sistémicas da AR, nomeadamente astenia (juntamente com a IL-1), anemia e disfunção do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal e regula a resposta inflamatória de fase aguda e o metabolismo lipídico^{226,228,240}.

Outras citocinas intervêm na AR, nomeadamente as IL-18 e IL-33 que assumem, entre outras ações, a ativação de neutrófilos²⁴⁰. Os neutrófilos são das células inflamatórias mais

INTRODUÇÃO

abundantes no fluido sinovial e na interface *pannus*/cartilagem das articulações afetadas²⁴². Estas células participam na sinovite através da indução de citocinas e de quimiocinas, que têm um papel essencial na amplificação da inflamação e no recrutamento de mais neutrófilos ao local lesado, e mediante a síntese de PG, proteases e de intermediários de ROS^{240,243}.

Na AR a resposta imunitária inata celular é ativada localmente na articulação reumatóide. Esta resposta é mediada na sinóvia sobretudo por fibroblastos residentes e monócitos, macrófagos e neutrófilos infiltrantes que fagocitam agentes patogénicos, partículas de agregados macromoleculares e células apoptóticas²⁴⁴. A ativação da fagocitose promove a ativação de várias moléculas lesivas inespecíficas, nomeadamente O_2^- , H_2O_2 , oxiácidos de halogénios, NO^\bullet e $ONOO^-$ e de diversas proteases que, coletivamente, visam a destruição do material fagocitado²⁴⁴. Este processo ocorre, como referido anteriormente, dentro de fagossomas que restringem a sua ação destrutiva, protegendo a célula hospedeira e os tecidos envolventes. No entanto, e apesar da presença no soro e na matriz extracelular de inibidores de proteases e de proteínas capazes de resgatar radicais livres, as células fagocitárias ativadas libertam para o meio extracelular concentrações significativas de RS infligindo danos e predispondo a articulação reumatóide à inflamação crónica e à produção de auto-antígenes²⁴⁴.

Não sendo possível testar diretamente a função de neutrófilos na AR humana, tal tem sido realizado *in vivo* em modelos experimentais de AR²⁴². Os modelos experimentais de AR têm fornecido informações relevantes sobre o processo inflamatório nesta patologia²⁴⁴. Vários destes modelos imitam os diferentes aspetos da patogénese diversificada desta patologia humana²¹⁸. Quase todos os modelos evidenciam as características gerais da AR, concretamente, erosão da articulação, infiltração celular, produção de citocinas e a proliferação de células que são características da AR humana²¹⁸. Diversos agentes podem induzir artrite em murganhos e ratos, incluindo bactérias (p.ex. do género *Mycoplasma*, *Borrelia*, *Staphylococcus* e *Yersinia*), componentes bacterianos (p.ex. parede celular de *Mycobacterium* e de *Streptococcus*), antígenos ubíquos, óleos adjuvantes puros (p.ex. óleo mineral) e proteínas específicas da cartilagem, nomeadamente colagénio tipo II bovino (CII) e proteoglicano humano²⁴⁵. Alguns dos modelos experimentais de artrite, designados de modelos *espontâneos*, foram desenvolvidos em animais transgénicos, p.ex. o rato transgénico TNF- α , capaz de produzir aquela citocina em grande quantidade e de manifestar

INTRODUÇÃO

uma artrite erosiva²⁴⁵. Certos modelos experimentais mimetizam todo o processo da patogénese da doença como, p.ex., o modelo da AR induzida pelo colagénio (CIA), um dos modelos animais de AR mais usados^{218,242,245}. A utilização deste modelo de AR no rato tem ajudado investigadores clínicos e pré-clínicos na compreensão da complexidade da AR ao nível celular e molecular²¹⁸. No modelo CIA a AR é induzida mediante administração de CII, um componente da matriz extracelular da cartilagem articular das articulações diartrodiais^{246,247}. A cartilagem articular é composta por uma matriz extracelular densa, com condrócitos finamente dispersos. Essa matriz é constituída maioritariamente por água, colagénio, proteoglicanos e, com outras proteínas e glicoproteínas, não colagénicas, presentes em menor quantidade²⁴⁷. O colagénio e os proteoglicanos representam 60% e 10 % de peso seco, respetivamente. Cerca de 90% a 95% do colagénio presente na matriz extracelular densa é CII²⁴⁷. Estes constituintes asseguram as propriedades biomecânicas da cartilagem, conferindo resistência à tração e capacidade de carga^{247,248}. Na AR a destruição da cartilagem está associada à redução da síntese de componentes da matriz pelos condrócitos articulares e a uma maior produção de enzimas proteolíticas na matriz, principalmente das metaloproteases^{237,211}. Trentham *et al.*²⁴⁹, num estudo publicado em 1977, descreveram pela primeira vez o modelo CIA em ratos imunizados com CII. Este modelo é considerado de especial interesse, em parte, porque os ratos com CIA, como alguns (não todos) dos doentes com AR, expressam níveis elevados de anticorpos CII²⁵⁰. Nesta patologia, a destruição da cartilagem está associada à redução da síntese de componentes da matriz pelos condrócitos articulares e a uma melhor distribuição das enzimas proteolíticas na matriz, principalmente das metaloproteases^{237,211}. A intervenção do sistema de complemento na patogénese da AR, um componente fundamental da imunidade inata, foi confirmada em estudos com o modelo CIA em ratos²⁰⁹. As semelhanças da patologia articular (incluindo erosão) na CIA e na AR humana têm possibilitado o uso deste modelo no desenvolvimento de medicamentos para o tratamento da AR²⁴⁶.

Evidências acumuladas de estudos *in vitro* e *in vivo* relativas a pequenos frutos, concretamente a framboesas vermelhas e/ou respeitantes a compostos fenólicos presentes nestes frutos indiciam que a ingestão de *Rubus idaeus* L. poderá efeitos anti-inflamatórios no organismo humano^{17,103}. A pesquisa dos estudos publicados relativos à investigação de efeitos anti-inflamatórios destes pequenos frutos foi realizada na *Pubmed* da *Medline*, com uso dos seguintes descritores: ‘red raspberry’, ‘raspberry’, ‘ellagitannins’, ‘anthocyanins’ e

INTRODUÇÃO

‘flavonoids’ em associação com ‘inflammation’, ‘anti-inflammatory’, ‘chronic disease’, ‘oxidative stress’ e ‘clinical trials’. No total foram recenseados onze estudos, cinco publicados até 2010 e seis publicados entre 2011 e 2015 (Novembro). Os artigos recenseados compreendem dois estudos de intervenção em humanos que incluíram no protocolo a ingestão destes pequenos frutos vermelhos, entre outros frutos, cinco estudos *in vitro* cujo efeito anti-inflamatório foi atribuído aos polifenóis maioritários, antocianinas e elagitaninos, tal como se encontram nos frutos, e quatro estudos *in vivo* em modelos experimentais em ratos, dois dos quais reportam igualmente dados de estudos *in vitro*. Os estudos *in vitro* e *in vivo*, em modelos animais, foram todos realizados com extratos de framboesa ricos em polifenóis e/ou com frações destes, concretamente, frações enriquecidas em antocianinas ou elagitaninos. Os efeitos de extratos e de frutos de *Rubus idaeus* L. avaliados em estudos *in vitro* e *in vivo*, respetivamente, publicados até 2015, incluindo elementos de dois estudos de intervenção em humanos foram reunidos na Tabela 1.12.

Tabela 1.12 – Atividade anti-inflamatória de frutos/extratos de *Rubus idaeus* L.: estudos publicados entre 2001 e 2015

TIPO DE ESTUDO ^(Ano)	BREVE DESCRIÇÃO DO EFEITO ANTI-INFLAMATÓRIO ^(*)	REFERÊNCIAS
A. 2001/2010		
<i>In vitro</i> ⁽²⁰⁰¹⁾	Um extrato aquoso de <i>Rubus idaeus</i> L. rico em antocianinas, na dose de 125 µg/mL exibiu, <i>in vitro</i> , uma actividade inibitória das COX-1 e COX-2, comparável à dos anti-inflamatórios comerciais ibuprofen e naproxen, na concentração de 10 µM.	Seeram <i>et al.</i> ¹¹⁸
<i>In vitro</i> ⁽²⁰⁰²⁾	Um extrato de sementes de <i>Rubus idaeus</i> L., rico em proantocianidinas, na dose de 50 µg/mL, foi efetivo na inibição <i>in vitro</i> da H ₂ O ₂ e da expressão do VEGF, induzida pelo TNF-α em queratinócitos normais humanos da linhagem HaCaT.	Roy <i>et al.</i> ⁸²
<i>In vivo</i> ⁽²⁰⁰⁴⁾ , em humanos	Os efeitos da ingestão, na dieta, de níveis baixos e elevados de vegetais, frutos de baga, incluindo framboesa vermelha, e de maçã sobre marcadores inflamatórios foram investigados num estudo de intervenção em humanos. Não foram encontradas diferenças significativas entre as 4 dietas avaliadas e os marcadores inflamatórios testados.	Freese <i>et al.</i> ¹⁵³
(* Vegetais, frutos de baga e maçã parte integrante de 4 dietas isocalóricas; Duração - 6 semanas; Desenho – aleatorizado, paralelo, 2 braços, C; N- 77, voluntários saudáveis, MF; n - 18/20; dose de framboesa – NR; FT – NR; Biomarcadores - P-Selectina e ICAM-1 do plasma, CPR do soro, Anticorpos para Ox-LDL, Anticardiolipina e Protrombina).		

INTRODUÇÃO

TIPO DE ESTUDO ^(Ano) (continuação)	BREVE DESCRIÇÃO DO EFEITO ANTI-INFLAMATÓRIO ^(**)	REFERÊNCIAS
<i>In vivo</i> ⁽²⁰⁰⁵⁾ , em humanos	A hipótese de uma ingestão aumentada de vegetais e frutos, incluindo frutos de <i>Rubus idaeus</i> L., modular a expressão da COX-2 foi investigada. Não foram encontradas diferenças significativas entre as 2 dietas avaliadas e a expressão genética do mRNA da COX-2. (* Vegetais e frutos, parte integrante de 2 dietas isocalóricas, com 300 g e 750 g FV, respetivamente; Duração - 8 semanas; Desenho – aleatorizado, cruzado, 2 braços, C; N- 39, voluntários saudáveis, MF; n - 19/20; dose de framboesa – NR; FT – NR; Biomarcadores: COX-2).	Almendingen <i>et al.</i> ¹⁵⁴
<i>In vitro</i> ⁽²⁰⁰⁵⁾	Extratos de <i>Rubus idaeus</i> L, ricos em polifenóis, e frações destes, concentrados de antocianinas e de elagitaninos, respetivamente, inibiram <i>in vitro</i> , nas doses de 20 e 50 µg/mL, a formação da PGE ₂ em macrófagos ativados.	Vuorela <i>et al.</i> ¹²³
<i>In vitro</i> ⁽²⁰⁰⁷⁾	Uma amostra de sumo de framboesa vermelha, na dose de 25 µL/mL, suprimiu <i>in vitro</i> , de modo significativo, em células humanas do cancro da próstata PC-3, a expressão da COX-2 induzida pelo TNF-α em 43%, via repressão do TNF-α, cuja expressão é dependente do NF-kB.	Boivin <i>et al.</i> ²⁵¹
<i>In vitro</i> ⁽²⁰¹⁰⁾	Extratos metanólicos, de acetato de etilo e de hexano de <i>Rubus idaeus</i> L., ricos em antocianinas, não exibiram, <i>in vitro</i> , na dose de 100 µg/mL, actividade inibitória das COX-1 e COX-2, comparável à dos anti-inflamatórios aspirina, Vioxx TM e Celebrex TM .	Bowen-Forbes <i>et al.</i> ²⁵²
B. 2011/2012		
<i>In vivo</i> ⁽²⁰¹¹⁾ , num Modelo Experimental	A administração diária de um extrato de framboesa vermelha a modelos experimentais com lesão nos tecidos hepáticos, induzida pela DEN, ao longo de 20 semanas, inibiu significativamente a expressão do VEGF nos tecidos lesionados avaliados. A taxa de inibição do VEGF variou com a dose de extrato administrada, de um modo dependente: -45%, -62% e -88% que o controlo, para doses baixa, média e alta, respetivamente. (**Estudo aleatorizado, C; Duração – 20 semanas; Modelo animal com lesão hepática induzida; Doença - Cancro; Espécie – Rato (Wistar machos, 130 g a 140 g); 5 grupos (n=20); FT – 436,62 mg EAG/100 g FF; Dose – 0,75, 1,5 e 3,0 g/Kg PV; Biomarcador - VEGF).	Chen <i>et al.</i> ¹⁴⁴
<i>In vitro e in vivo</i> ⁽²⁰¹¹⁾ , num Modelo Experimental	A ingestão diária de sumo de framboesa das cv. Cardinal, Glen Ample e Tulameen, numa dose equivalente ao consumo de 275 ml por um humano de 70 kg, durante 12 semanas, contrariou o desenvolvimento da aterosclerose precoce, induzida em hamsters através uma dieta aterogénica. Os sumos continham teores em antocianinas e elagitaninos semelhantes. Todos os sumos de <i>Rubus idaeus</i> L. promoveram um ↓ na produção de O ₂ [•] no coração e na aorta, e ↑ a atividade da GPx hepática. Observou-se um ↑ significativo nas atividades da SOD e da PON apenas para os animais suplementados com os sumos de Tulameen e de Glen Ample, respetivamente. Para além dos efeitos positivos nos parâmetros relativos ao stresse oxidativo, os três sumos possibilitaram uma ↓ do nível de triglicéridos no plasma; o consumo dos sumos de Tulameen e de Cardinal ↓ significativamente o colesterol total plasmático e colesterol-LDL; os hamsters suplementados com o sumo Cardinal ↑ o colesterol-HDL e ↓ o peso corporal, significativamente.	Suh <i>et al.</i> ¹⁴³

INTRODUÇÃO

TIPO DE ESTUDO ^(Ano) (continuação)	BREVE DESCRIÇÃO DO EFEITO ANTI-INFLAMATÓRIO ^(**)	REFERÊNCIAS
	(**Estudo aleatorizado, C; Duração – 12 semanas; Modelo de aterosclerose induzida por uma dieta rica em gordura); Doença – Aterosclerose; Espécie – Hamster dourado (machos recém-desmamados, 60 g a 80 g); 5 grupos (n=10); FT – NR; Dose – equivalente ao consumo de 275 mL/dia por um humano de 70Kg; Biomarcadores – Atividade do O ₂ ^{•-} , GPx hepática, SOD, PON, colesterol total, colesterol-HDL, colesterol-LDL e triglicéridos).	Suh <i>et al.</i> ¹⁴³
<i>In vitro e in vivo</i> ⁽²⁰¹²⁾, num Modelo Experimental		
	Um extrato de <i>Rubus idaeus</i> L. rico em polifenóis, normalizado, na dose de 50 µg/ml, foi efetivo na ↓ da taxa de degradação do CII e proteoglicano e no ↑ da inibição da ativação das MMP-2 e MMP-9, <i>in ex vivo</i> , numa cultura explante de cartilagem nasal de bovino, tratada com IL-1β. Este extrato evidenciou igualmente efeitos anti-inflamatórios, <i>in vivo</i> , na dose de 1,2 g/Kg PV, em ratos, com artrite induzida por <i>M. tuberculosis</i> . Os animais suplementados 30 dias com o extrato, naquela dose, evidenciaram uma redução significativa da inflamação (↓ 54%), da formação de pannus (↓ 74%), de danos na cartilagem (↓ 67%) e da reabsorção de osso (↓ 67%). O extrato administrado na dose de 0,3 g/Kg PV não mostrou efeitos anti-inflamatórios.	Jean-Gilles <i>et al.</i> ¹⁴¹
	(**Estudo aleatorizado, C; Duração – 4 semanas; Modelo de artrite induzida por antigénio); Doença – Artrite; Espécie – Rato (Lewis machos, 130 g a 150 g); 4 grupos (n=6); FT – NR; Doses – 0,3 e 1,2 g/Kg PV; Biomarcadores - NR).	
C. 2013/2015		
<i>In vitro e in vivo</i> ⁽²⁰¹³⁾, num Modelo Experimental		
	Um extrato de <i>Rubus idaeus</i> L. enriquecido em elagitanninos evidenciou propriedades anti-inflamatórias na mucosa gástrica <i>in vitro</i> , em células gástricas AGS estimuladas com TNF-α e IL-1β, e <i>in vivo</i> , num modelo experimental de lesão gástrica. <i>In vitro</i> , o extrato com ETs, na dose de 2 µg/mL, inibiu o aumento da transcrição e inibiu a translocação do fator NF-kB (p65) e a secreção de IL-8, em células AGS estimuladas por ambas as citocinas.	Sangiovanni <i>et al.</i> ¹⁴²
	<i>In vivo</i> , na dose diária de 20 µg de ETs/PV, o extrato apresentou um efeito protetor da mucosa gástrica dos animais, contra o stresse oxidativo induzido pelo etanol. Nos ratos tratados com ETs da framboesa observou-se uma ↓ dos Índice de Úlcera, na expressão do fator de transcrição NF-kB e na secreção da CINC-1. Os ETs da framboesa contrariaram o estado oxidativo induzido pelo etanol, considerados os valores da Eq. Trolox e das SOD e CAT, avaliadas <i>ex vivo</i> , para os ratos tratados vs. ratos do controlo negativo.	
	(**Estudo aleatorizado, C; Duração – 10 dias; Modelo animal com lesão gástrica induzida; Doença – úlcera gástrica; Espécie – Rato (Wistar machos, 175 g a 200 g); 5 grupos (n=6); FT – NR; Dose – 20,0 mg de ETs/Kg PV/dia; Biomarcadores – Eq. Trolox, SOD, CAT, fator de NF-kB, CINC-1, homóloga para o rato da IL-8).	
<i>In vitro e in vivo</i> ⁽²⁰¹⁴⁾, num Modelo Experimental		
	Fração de um extrato de <i>Rubus idaeus</i> L. contendo antocianinas (ERA) evidenciou propriedades anti-inflamatórias <i>in vitro</i> , em macrófagos RAW 264,7 ativadas por LPS/IFN-γ, <i>in vivo</i> , num modelo experimental de colite aguda. <i>In vitro</i> , o extrato ERA, na dose de 150-200 µg/mL, inibiu a produção de NO, o aumento da transcrição e inibiu a translocação do fator NF-kB (p65) a expressão da iNOS e da COX-2 e a secreção de TNF-α, IL-6, em células RAW264,7 ativadas.	Li <i>et al.</i> ¹⁴⁰

INTRODUÇÃO

TIPO DE ESTUDO ^(Ano)	BREVE DESCRIÇÃO DO EFEITO ANTI-INFLAMATÓRIO ^(**)	REFERÊNCIAS
(continuação)		
	<p><i>In vivo</i>, na dose diária de 20 mg de ERA/PV (extrato liofilizado reconstituído em soro fisiológico, administrado diariamente no grupo de animais tratados, via i.p., por 10 dias), o extrato apresentou um efeito protetor da mucosa do cólon dos ratos, contra o stresse oxidativo induzido pelo DSS. Nos ratos tratados com ERA observou-se uma ↓ significativa da perda de peso, do encurtamento do cólon e uma alteração morfológica nas células vs. grupo controle; nos parâmetros hematológicos observou-se uma ↓ significativa nas contagens leucocitárias.</p> <p>(** Estudo aleatorizado, C; Duração – 10 dias; Modelo experimental de colite aguda induzida pelo DSS; Doença – úlcera no cólon; Espécie – Rato (BalB/e machos, com 6-8 semana); n°- NR, pelo menos 3 grupos; NR- n° de animais por grupos; FT – NR; Dose – 20,0 mg de ERA/Kg PV/dia; contagens leucocitárias, análise histológica ao cólon; controle diário do peso).</p>	Li <i>et al.</i> ¹⁴⁰

** Alguns elementos do ensaio *in vivo*; C – Controlado; CII – colagénio do tipo II; CAT – Catalase; CINC-1 – citocina neutrófilo induzida quimotratante-1; CPR – proteína C-reativa; COX – Ciclooxigenase; DSS – dextrano sulfato de sódio; DEN – Dietilnitrosamina; EAG – equivalentes de ácido gálico; ERA – fração de um extrato de framboesa contendo antocianinas; Eq. Trolox – Equivalente Trolox; ETs – Elagitaninos; FT – fenóis totais; FF – frutos frescos; FV – frutos e vegetais; GPx – glutathione peroxidase; HDL – lipoproteína de alta densidade; ICAM-1 – molécula de adesão intracelular 1; IL – Interleucina; LDL – lipoproteína de baixa densidade; LPS – lipopolissacárido; ITN- interferão; iNOS – óxido nítrico sintetase; MF – masculino, feminino; mRNA – ácido ribonucleico mensageiro; MMP – metaloproteases; n – n° de sujeitos/grupo; NR – não referido; NF-kB – Fator de transcrição NF-kB; O₂[•] – anião superóxido; Ox LDL – lipoproteínas de baixa densidade oxidadas; PGE₂ – prostaglandina E₂; PV – peso vivo; PON – paraoxonase; SOD – superóxido dismutase; TNF-α – Fator de necrose tumoral-α; VEGF – Fator de crescimento vascular endotelial.

Os dois ensaios de intervenção em humanos considerados na pesquisa bibliográfica não se referem à suplementação da dieta com framboesa mas sim à investigação de potenciais efeitos anti-inflamatórios decorrentes de uma ingestão aumentada de vegetais e frutos, entre os quais framboesas, pelo que não corroboram os efeitos anti-inflamatórios observados nos estudos pré-clínicos^{153,154}.

De acordo com o reportado nos estudos pré-clínicos publicados, as propriedades anti-inflamatórias da framboesa vermelha foram atribuídas sobretudo aos seus polifenóis maioritários elagitaninos e antocianinas (Tabela 1.12 A - C). Estudos pré-clínicos realizados com outros frutos de baga sugerem igualmente que o efeito anti-inflamatório destes pequenos frutos se deve ao seu conteúdo em polifenóis, nomeadamente em antocianinas^{17,253,254}. Os efeitos anti-inflamatórios de elagitaninos e seus metabolitos têm sido igualmente observados em vários estudos pré-clínicos realizados com outros frutos^{255,256}. Para além destes fitoquímicos, os frutos maduros de *Rubus idaeus* L. contêm teores reduzidos de ácido elágico e derivados e de proantocianidinas e teores diminutos de

INTRODUÇÃO

quercetina e seus derivados. Para estes polifenóis também existem dados de estudos pré-clínicos, respeitantes aos compostos puros e enquanto constituintes de matrizes alimentares várias, que corroboram tais ações^{257,258,259}. Os efeitos anti-inflamatórios da romã, p. ex, têm sido atribuídos ao ácido elágico e derivados^{260,261}.



Figura 1.9 - Representação esquemática da interrelação dos efeitos antioxidante e anti-inflamatório potencial de (poli)fenóis na dieta.

(Adaptado de Joseph *et al.*¹⁷)

(da esquerda para a direita) TNF-α – Fator de necrose tumoral-α; IL – Interleucina; ROS – Espécies reativas de oxigênio; NOS – Espécies reativas de azoto; OH• – Radical hidroxil; O₂• – Radical superóxido; ONOO• – Radical peroxinitrito; NO• – Monóxido de azoto; NF-κB – Fator nuclear kappa B; AP-1 – Ativador de Proteína 1.

Enquanto oxidantes naturais os polifenóis têm potencial para interromper o ciclo vicioso que se instala num ambiente de inflamação e stresse oxidativo (Figura 1.9). Os polifenóis podem atuar como antioxidantes capazes de resgatar ou inibir a produção de ROS e RNS, podendo, em alguns casos, quelatar metais (p.ex. ferro e cobre), ativar enzimas antioxidantes (p.ex. enzimas desintoxicantes de fase II), inibir enzimas pró-oxidantes (p.ex. Xox, COX, LOX, Nox e iNOS), reduzir radicais α-tocoferil, aumentar os níveis de ácido úrico ou modificar a atividade pró-oxidante de antioxidantes de baixo peso molecular (p.ex. β-caroteno)^{262,263}. Para além da atividade antioxidante, vários estudos sugerem que os efeitos biológicos *in vivo* de diversos compostos fenólicos, incluindo antocianinas e seus metabolitos, não decorrem das suas propriedades antioxidantes^{17,5}. Segundo Joseph *et al.*¹⁷, *in vivo* os polifenóis apresentam atividade anti-inflamatória, influenciando a

INTRODUÇÃO

ativação/inibição de diversos processos de sinalização celular, como a modulação da atividade de cinases redox sensíveis, que resulta na transcrição de fatores de ativação, nomeadamente dos fatores de transcrição NF- κ B e ativador de proteína 1. A manutenção do fator NF- κ B inativo, via inibição das proteínas-cinases envolvidas na transdução de sinal, impede a transcrição dos genes que codificam as citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias, TNF- α , IL-1, IL-6 e IL-8. A inibição da produção destes mediadores inflamatórios interrompe igualmente o ciclo vicioso inflamação/stresse oxidativo que está na base de várias doenças crónicas.

A prevalência global de NCDs tem aumentado dramaticamente resultado de uma globalização que se vai sentindo um pouco por todo o mundo, com impactos sociais consideráveis nomeadamente no respeitante a estilos de vida mais sedentários, níveis de stresse elevados e alterações na dieta. Em 2012, morreram 38 milhões de pessoas de doenças não transmissíveis (mais de 5 milhões que em 2008; 68% do total de mortes), 40% das quais tinham idade inferior a 70 anos²⁵¹. Segundo a OMS estas mortes prematuras podem ser prevenidas. Doenças crónicas como diabetes *mellitus*, obesidade, doenças cardiovasculares e cancro, entre outras, causam igualmente morbilidade elevada e incapacidade, com consequências sociais graves e implicações económicas significativas nos sistemas de saúde de diversos países²⁵²⁻²⁵⁴. Nesta conjuntura, assiste-se à emergência de um novo paradigma focado no bem-estar das pessoas e orientado para a prevenção da doença. A promoção de hábitos alimentares saudáveis, tais como o aumento da ingestão de frutas e produtos hortícolas, a principal fonte de polifenóis bioativos, constitui uma via para uma alimentação mais saudável considerada essencial para debelar este flagelo do século XXI⁵. A distribuição gratuita de hortofrutícolas frescos e transformados em escolas para crianças em idade escolar, um programa de educação alimentar cofinanciado pela UE^{255,256}, constitui uma estratégia do novo paradigma que visa a proteção da saúde das populações.

Frutas e hortícolas frescos são alimentos nutricionalmente densos, regra geral pouco energéticos, abundantes em micronutrientes, fibras e compostos fenólicos bioativos. O aumento da disponibilidade, acessibilidade e do consumo destes alimentos (≥ 400 g/dia) são recomendações globalizadas que visam promover a saúde das populações, controlar e prevenir NCDs^{252,5}.

INTRODUÇÃO

A ingestão de refeições desequilibradas, muito calóricas e com altos teores de gordura e/ou açúcar podem resultar em hiperlipidemias e hiperglicemias pós-prandiais que estão envolvidas no fenómeno aterogénico e, conseqüentemente, são fatores de risco no desenvolvimento de DCV²⁶⁴.

Assim, vários autores têm vindo a demonstrar que o excesso de gordura e/ou açúcares da dieta geram stresse oxidativo e inflamatório no organismo²⁶⁵ para além de um aumento agudo de glicemia e lipemia²⁶⁶.

Alguns estudos têm mostrado que os mecanismos inflamatórios podem estar associados com a lipemia pós-prandial²⁶⁷ mas também é sabido que a ingestão aguda de refeições ricas em gordura e/ou açúcar fomenta a produção de radicais livres em excesso, gerando stresse oxidativo e também stresse inflamatório com a conseqüente libertação de citocinas pró-inflamatórias na circulação sanguínea²⁶⁸.

Esta dependência inter-relacionada está na génese de doenças crónicas, pois o organismo humano está sempre em condições de stresse oxidativo e inflamatório, deixando a inflamação de ser um processo de defesa autolimitado, para se tornar num dos vértices do síndrome metabólico e/ou transformar-se numa doença inflamatória crónica, como a artrite reumatoide ou a colite. Assim, os marcadores de inflamação têm um papel importante no prognóstico de várias doenças.

Do mesmo modo, o stresse oxidativo desregula as funções celulares e está implicado em várias doenças, tais como neurodegenerativas, metabólicas e cancro. Por esta razão, o desenvolvimento de biomarcadores de stresse oxidativo parecem ser de imenso interesse no diagnóstico, prognóstico e soluções terapêuticas, pois o estado oxidativo prolongado pode desencadear apoptose e necrose das células e ser um dos intervenientes de numerosas condições patológicas como DCV, doenças degenerativas como a doença de Alzheimer e doenças inflamatórias crónicas.

Na verdade o organismo tem defesas endógenas para combater os radicais livres, tais como as enzimas antioxidantes superóxido dismutase (SOD), catalase, glutathione redutase (GSH), glutathione peroxidase (GPx) e outras, mas quando estes radicais são libertados em excesso é necessário ajuda veiculada por alguns alimentos ricos em antioxidantes.

INTRODUÇÃO

O papel benéfico de frutas e vegetais na prevenção de doenças tem sido atribuído à grande variedade de antioxidantes (polifenóis e vitaminas) contidos nestes alimentos.

Há evidências que sugerem um papel importante de dietas ricas em vegetais na redução do risco de mortes por doenças mediadas por stresse oxidativo e inflamatório, havendo uma correlação negativa entre o consumo destes alimentos e os marcadores de inflamação²⁶⁹ especialmente nos valores de TNF- α e IL-6²⁷⁰.

3. BIODISPONIBILIDADE E METABOLISMO DE COMPOSTOS FENÓLICOS BIOATIVOS

Os alegados efeitos benéficos da ingestão de *Rubus idaeus* L. na dieta atribuem-se principalmente aos seus antioxidantes naturais vitamina C, elagitaninos e antocianinas. Não chega avaliar a sua presença no fruto para concluir acerca da sua contribuição para a bioatividade. Assim, a avaliação da biodisponibilidade que inclui os mecanismos de absorção, distribuição, metabolismo e excreção de fitoquímicos é essencial à fundamentação científica de alegações de saúde sobre alimentos. Os estudos de intervenção em humanos e em animais sobre a absorção destes compostos, elagitaninos e antocianinas presentes na framboesa vermelha, são recentes e pouco numerosos^{75,78,271}. E têm sido efetuados com animais, humanos saudáveis e ileostomizados.

Assim Borges *et al.*⁷⁸ estudaram a biodisponibilidade de elagitaninos em ratos, após ingestão de sumo de framboesa. Foram colhidas amostras de fluídos biológicos como urina, sangue, fezes, e de tecidos (estômago, duodeno/jejuno, íleo e outras partes do trato intestinal). As amostras foram tratadas e analisadas por HPLC-MS², não tendo sido encontrados vestígios de metabolitos daqueles compostos 1 h após a ingestão. Pelo contrário, Espín *et al.*²⁷², num estudo realizado com porco ibérico alimentado com bolotas de carvalho, uma fonte de elagitaninos, observou a metabolização daqueles polifenóis a urolitinas, derivados de ácido elágico metabolizados pela flora intestinal. Estes investigadores detetaram 31 metabolitos, 25 urolitinas e 6 derivados do ácido elágico. Não foram detetados metabolitos destes polifenóis em tecidos fora do trato intestinal. No jejuno, os elagitaninos da dieta originaram ácido elágico que foi posteriormente metabolizado pela flora intestinal a urolitinas, produzindo sucessivamente urolitinas D, C, A e B. No plasma foram detetados

INTRODUÇÃO

metabolitos dos elagitaninos: sobretudo urolitina-A-3-O-glucurónido, urolitina-B-3-O-glucurónido e quantidades vestigiais de urolitina-C-3-O-glucurónido e ácido 3,8-O-dimetileláxico-2-O-glucurónido. Na bÍlis, encontraram 26 derivados do ácido elágico, glucurónidos e metilglucurónidos, e urolitinas A, C e D e seus derivados. Na urina foram excretados principalmente urolitina-A-3-O-glucurónido e urolitina-C-3-O-glucurónido. Segundo o reportado, estes dados traduzem um metabolismo hepático importante a par de uma ativa circulação enterohepática, explicando a persistência de urolitinas na urina, observada em estudos com humanos.

Cerda *et al.*²⁷¹ estudaram os teores de elagitaninos e ácido elágico em amostras de urina recolhida entre as 8h e as 56h após a ingestão (n= 40 voluntários), de uma única dose de framboesas vermelhas, morangos, nozes e vinho tinto. A monitorização dos compostos na urina recolhida entre as 8h e as 56h após a ingestão foi feita por HPLC-MS². Os resultados mostram que não foram excretados elagitaninos ou ácido elágico na urina. No entanto, foi detetada em algumas das amostras de urina^{271,273} a excreção do *8-dihidroxi-6H-dibenzo[b,d]pirano-6-um*, urilitina B, conjugado com ácido glucurónido. A percentagem média de metabolito excretado representou cerca de 2,8%, 3,4%, 6,5% e 16,6%, respectivamente, da quantidade de morangos, framboesas, vinho e nozes ingeridas²⁷¹. Dentro dos grupos, foram observadas diferenças interindividuais importantes no respeitante à quantidade de metabolito excretado.

González-Barrio *et al.*⁷⁵ monitorizaram os elagitaninos de *Rubus idaeus* L. na sequência do consumo de 300 g daqueles frutos em indivíduos ileostomizados e saudáveis. Os fluidos biológicos, urina, plasma e fluidos do íleo foram recolhidos até 48h após a ingestão dos frutos e analisados por HPLC-DAD-MS². Nas amostras de urina 7-48h dos indivíduos saudáveis foram encontrados os metabolitos urilitina-A-O-glucurónido e urilitina-B-O-glucurónido. Foram encontradas variações interindividuais importantes no perfil de urilitinos dos diferentes indivíduos, sugerindo diferenças na microflora do cólon, responsável pela degradação dos elagitaninos. No fluido obtido dos voluntários ileostomizados foi recuperado 23% da sanguina H-6, 4 h após a ingestão e 243% de ácido elágico, provavelmente resultado da hidrólise de elagitaninos no estômago e no intestino delgado. Nestes indivíduos, cujo intestino grosso não funciona, não foram detetados urilitinas, sustentando que estes derivados do ácido elágico são obtidos por ação da flora do

INTRODUÇÃO

intestinal. A eliminação de ácido elágico e de ácido elágico-O-glucurônido na urina foi inferior a 1% da ingestão. Os dados reportados neste estudo indicam um baixo nível de absorção e de excreção de ácido elágico após o consumo de framboesas frescas nos humanos.

De uma forma geral pode considerar-se o esquema da Figura 1.10 como representativo do metabolismo dos elagitaninos.

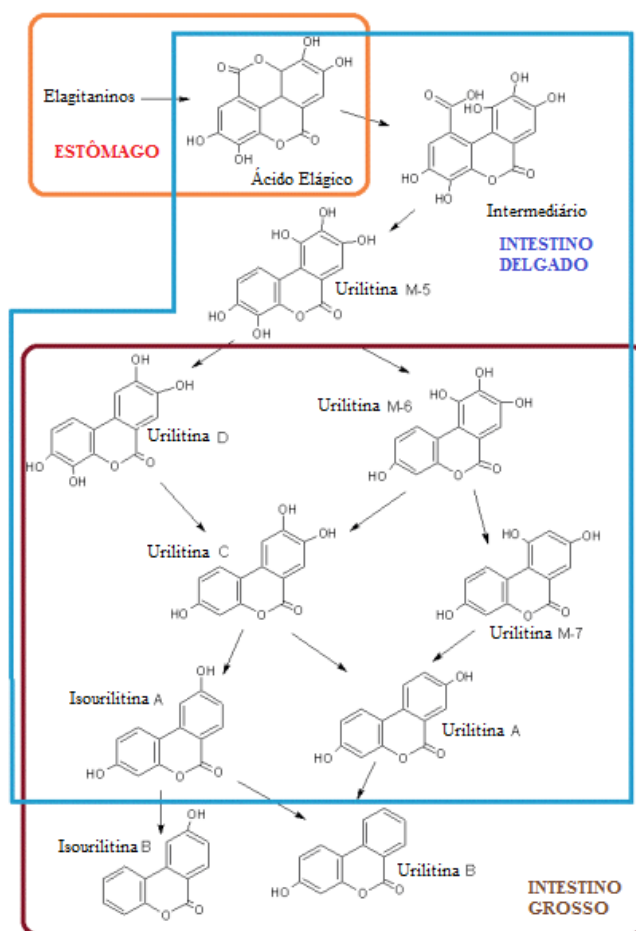


Figura 1.10 - Metabolismo dos elagitaninos e ácido elágico.
(Adaptado de Lipińska *et al.*²⁷⁴)

Borges *et al.*⁷⁸ e González-Barrio *et al.*⁷⁵, nos estudos acima citados avaliaram também a biodisponibilidade das antocianinas presentes em framboesas. No sumo de *Rubus idaeus* L. ingerido por ratos foram analisadas 9 antocianinas num total de 918 nmol, sobretudo cianidina-3-soforósido e cianidina-3-glucosilrutinosídeo (56% e 23% do total). Os perfis de

INTRODUÇÃO

HPLC-DAD das antocianinas ao comprimento de onda de 520 nm no plasma, urina, fezes e órgãos do trato intestinal apresentaram muitas semelhanças com o do sumo ingerido. 1 h depois da ingestão as 3 antocianinas maioritárias foram detetadas no plasma em concentrações da ordem dos nM. 3 h após a ingestão, mais de 50% das antocianinas tinha desaparecido, persistindo, 40% e 6,5% destes polifenóis no íleo e no resto do trato intestinal, respectivamente. Às 4h não foram encontrados vestígios daquelas antocianinas. Após 24 h, foram excretadas nas fezes e na urina apenas 1,5% e 1,2% das antocianinas ingeridas⁷⁸.

Investigadores da Universidade de Glasgow estudaram a biodisponibilidade de 204 µmol de antocianinas, maioritariamente cianidina-3-soforósido, cianidina-3-glucosilrutinosido (55 e 22% do total), presentes em 300 g de framboesas consumidas por voluntários ileostomizados⁷⁵. Os dados obtidos mostraram que 40% das antocianinas ingeridas foram recuperadas no fluido ileal, indicando que, apesar da influência do pH, em sujeitos com um cólon intacto, uma proporção considerável daquelas antocianinas da framboesa passa do intestino delgado para o intestino grosso, podendo ser metabolizadas a ácidos fenólicos pela microflora intestinal⁷⁵.

Os resultados apresentados mostram que os compostos fenólicos presentes na framboesa podem ser metabolizados ao nível do trato intestinal sendo detetados em fluidos biológicos, o que mostra a sua possível contribuição para um efeito positivo na saúde de indivíduos consumidores desta fruta.

4. ALEGAÇÕES DE SAÚDE SOBRE ALIMENTOS NA UE

O incentivo do consumo de alimentos funcionais constitui uma ferramenta de promoção da saúde pública, em particular no que se refere à manutenção da saúde das populações, contribuindo deste modo para a prevenção de doenças crónicas²⁷⁵. Na UE, alimentos funcionais são considerados alimentos que, integrados na dieta e consumidos em quantidades espectáveis, proporcionam benefícios relevantes numa ou várias funções específicas do organismo, fundamentados cientificamente, contribuindo para a promoção da saúde e do bem-estar ou para a redução de um risco de doença, para além dos efeitos nutricionais que lhes são próprios²³². Trata-se sobretudo de um conceito científico

INTRODUÇÃO

consensual e não uma categoria de alimentos bem definidos, diferentes dos já existentes. Os alimentos funcionais distinguem-se dos demais pelo facto de incluírem, nos rótulos ou publicidade, alegações de saúde conformes com o Regulamento (CE) n.º 1924/2006²⁷⁶ relativo a alegações nutricionais e de saúde sobre alimentos, seus atos modificativos e relacionados. Os tipos fundamentais de alegações de saúde consideradas neste diploma, alegações funcionais, relativas à redução de um risco de doença ou ao desenvolvimento e à saúde das crianças, apresentam-se na Figura 1.11.

ALEGAÇÕES DE SAÚDE			
FUNCIONAIS		RELATIVAS À/O	
ALEGAÇÕES FUNCIONAIS GENÉRICAS	NOVAS ALEGAÇÕES FUNCIONAIS	REDUÇÃO DO RISCO DE DOENÇA	DESENVOLVIMENTO E À SAÚDE DAS CRIANÇAS
(FG)	(FGN)	(RRD)	(DSC)
Art. 13.1	Art. 13.5	Art. 14.1.a	Art. 14.1.b.
Baseadas em evidências científicas bem estabelecidas, incluindo dados provenientes de estudos em humanos	Baseadas em novas evidências científicas, incluindo dados provenientes de estudos em humanos	Baseadas em evidências científicas específicas de estudos em humanos	Baseadas em evidências científicas de estudos em crianças

Figura 1.11 – Representação esquemática dos tipos fundamentais de alegações de saúde disponíveis no Regulamento (CE) N° 1924/2006

AS – Alegações de saúde; Art. – artigo.

As alegações funcionais, genéricas (art.13.1) e baseadas em novas evidências científicas (art.13.5) afirmam, sugerem ou dão a entender que existe uma relação entre uma categoria de alimentos, um alimento ou um constituinte alimentar, nutriente ou outra substância, no crescimento e desenvolvimento ou na manutenção de funções do organismo, como o controlo do peso, psicológicas e comportamentais, incluindo o controlo da sensação de saciedade ou ao emagrecimento, à redução do apetite ou à redução do valor energético do regime alimentar. As primeiras foram submetidas pelas entidades competentes dos diferentes Estados-Membros à Comissão Europeia até Janeiro de 2008 e baseiam-se em evidências

INTRODUÇÃO

científicas consensuais, bem estabelecidas. Desde então só podem ser desenvolvidas alegações funcionais fundamentadas com novas evidências científicas (art. 13.5).

As alegações de redução de risco de doença (art. 14.1.a) afirmam, sugerem ou dão a entender que o consumo de uma dada categoria de alimentos, de um alimento, nutriente ou outra substância reduz significativamente um fator de risco de desenvolvimento de uma doença.

As alegações relativas ao desenvolvimento e à saúde das crianças e/ou alegações genéricas usadas em géneros alimentícios destinados exclusivamente a crianças (art. 14.1.b), afirmam, sugerem ou dão a entender que a ingestão de uma categoria de alimentos, de um alimento ou de um constituinte de um dado alimento contribui significativamente para o desenvolvimento ou para a saúde das crianças.

Nos países da UE, o Regulamento (CE) nº 1924/2006 determina que as alegações de saúde sobre alimentos têm de ser avaliadas e pré-aprovadas. A Tabela 1.13 reúne os principais requisitos a considerar no desenvolvimento de alegações de saúde sobre alimentos. Na UE, alegações para a prevenção, tratamento ou cura de doenças humanas são reservadas a medicamentos, sendo proibidas em alimentos, incluindo suplementos alimentares³⁵.

A legislação vigente determina que as alegações de saúde sejam pré-aprovadas e constem do Registo da UE de Alegações Nutricionais e de Saúde (<http://ec.europa.eu/nuhclaims/>). As alegações estabelecidas nos artigos 13.5 e 14 requerem a submissão de um pedido de autorização e de um *dossier* contendo todos os elementos exigíveis (ver os requisitos fundamentais a considerar na implementação da legislação em vigor na Tabela 1.13). Em Portugal, estes pedidos de autorização devem ser submetidos à Direção-Geral da Alimentação e Veterinária¹, abreviadamente DGAV, que verifica se a documentação entregue satisfaz as exigências estabelecidas. Após a aprovação preliminar da entidade competente do Estado-Membro, as alegações são submetidas à Autoridade Europeia da Segurança Alimentar (EFSA, abreviatura de ‘European Food Safety Authority’) para avaliação científica. Concluída a avaliação científica, esta agência europeia pública

¹ <http://www.dgv.min-agricultura.pt/portal/page/portal/DGV/genericos?generico=5924898&cboui=5924898>

INTRODUÇÃO

opiniões científicas relativa à fundamentação científica das alegações, considerando os dados científicos apresentados. Finalmente, a Comissão Europeia, em colaboração com os Estados-Membros, decide sobre a aprovação ou rejeição das alegações propostas, sendo a decisão publicada num diploma, geralmente um Regulamento, e tornada pública no Jornal Oficial da União Europeia e incluiu as alegações avaliadas no Registo da UE.

Tabela 1.13 - Implementação do Regulamento (CE) N° 1924/2006: principais requisitos a considerar no desenvolvimento de alegações de saúde sobre alimentos.

REQUISITO LEGAL <small>(referência no diploma)</small>	ALEGAÇÃO DE SAÚDE			
	FG <small>(Art. 13.1)</small>	NF <small>(Art. 13.5)</small>	AS DRR <small>(Art. 14.1.a)</small>	AS DSC <small>(Art. 14.1.b)</small>
REGULAMENTO (CE) N° 1924/2006*				
A alegação de saúde deve satisfazer /ser ...				
I. Condições Gerais , nomeadamente:				
Verdadeira, clara, fiável <small>(Artigo 3)</small> , compreensível <small>(Artigo 5.2)</small> , de uso justificável <small>(Artigo 6.2)</small> , fundamentada em elementos e dados relevantes <small>(Artigo 6.3)</small> .	✓	✓	✓	✓
No alimento, o nutriente(s)/substância(s) para o qual a alegação é realizada está presente numa quantidade que irá produzir o efeito fisiológico alegado, numa forma que é biodisponível para o organismo <small>(Artigo 5.1)</small> .	✓	✓	✓	✓
II. Condições Específicas , nomeadamente:				
Autorizada para uso após avaliação científica pela AESA <small>(Artigo 10)</small> ;	✓	✓	✓	✓
Submetida a um processo de autorização acelerado <small>(Artigo 18)</small> ;	X	✓	X	X
Submetida a um processo de autorização complexo <small>(Artigo 15-17, 19)</small> .	X	X	✓	✓
REGULAMENTO (CE) N° 353/2008**				
III. Um pedido de autorização de uma alegação de saúde ...				
Deve ser desenvolvido e apresentado em conformidade com as regras técnicas estabelecidas no Anexo <small>(Artigo 10)</small> ;	X	✓	✓	✓
Deve abranger uma única relação entre o nutriente ou outra substância, ou um alimento ou uma categoria e alimentos e um único efeito alegado <small>(Artigo 2)</small> ;	✓	✓	✓	✓
Pode ser relativo a novas evidências científicas genéricas <small>(Artigo 1.b, 4)</small> ;	X	✓	X	X
Deve incluir um pedido de proteção de dados de propriedade industrial, quando solicitado <small>(Artigo 1.b, 4)</small> ;	X	✓	✓	✓
Deve incluir um <i>dossier</i> completo contendo toda a informação científica relevante <small>(Artigo 1.a)</small> ;	X	X	✓	✓
Deve ser fundamentado principalmente com base em estudos realizados no ser humano <small>(Artigo 5; Anexo)</small> ;	✓	✓	✓	X
Deve ser fundamentado principalmente com base em estudos realizados em crianças <small>(Artigo 5; Anexo)</small> .	X	X	X	✓

*- Relativo a alegações nutricionais e de saúde sobre alimentos, e atos modificativos; **que estabelece normas de execução relativas aos pedidos de autorização de alegações de saúde, como previsto no artigo 15° do Regulamento (CE) N° 1924/2006, e atos modificativos; ✓ - aplicável; X - não aplicável; NF - novas alegações funcionais; DRR - alegações relativas à redução de um risco de doença; DSC - alegações relativas ao desenvolvimento e à saúde das crianças.

INTRODUÇÃO

A implementação do Regulamento (CE) nº 1924/2006 tem sido difícil. A maioria das alegações propostas, nomeadamente relativas a antioxidantes e à função imunológica, têm sido consideradas não estabelecidas ou insuficientemente fundamentadas²⁷⁷. Para suprir dificuldades e clarificar o processo de avaliação científica dos pedidos, a EFSA publicou documentos orientadores da constituição dos *dossiers* e da conceção de estudos científicos capazes de gerar provas relevantes (<http://www.efsa.europa.eu/en/nda/ndaguidelines>), contendo os pressupostos científicos adotados na avaliação de pedidos sobre determinados efeitos.

Os estudos científicos que fundamentam as alegações de saúde devem consistir principalmente em estudos no ser humano, intervencionais e/ou observacionais²⁷⁸. Cada pedido de autorização deve, entre outros aspetos (ver Tabela 1.13), indicar os efeitos fisiológicos benéficos propostos. Numa alegação funcional baseada em novas evidências científicas (art.13.5) o efeito benéfico deve referir-se à manutenção/melhoria de uma dada função do organismo. Para as alegações relativas à redução de um risco de doença (art.14.1.a), o efeito é considerado benéfico quando se refere à redução ou a uma alteração benéfica de um fator de risco para o desenvolvimento de uma doença humana.

A manutenção de uma função imune normal é considerada um efeito fisiológico benéfico quando indicado o aspeto específico da função imune que constitua o objetivo da alegação submetida²⁷⁹. A EFSA não considera que a capacidade, conteúdo ou propriedades antioxidantes de alimentos ou constituinte(s) ou baseadas na capacidade de resgate de ROS *in vitro*, medidas em sistemas modelo, exerça(m) um efeito fisiológico benéfico em humanos¹⁶². Também não são consideradas válidas, por enquanto, alegações sobre o estado ou a defesa antioxidante ou as relativas ao de defesa antioxidante, exceto para vitaminas e minerais essenciais com um papel na rede antioxidante humana comprovado.

INTRODUÇÃO

5. OBJETIVOS E DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

Considerando o atrás exposto, a investigação que se descreve teve por objetivo a caracterização química e biológica de frutos de *Rubus idaeus* L. produzidos em território nacional visando dar um contributo para o desenvolvimento de uma alegação de saúde.

Os objetivos específicos do trabalho experimental realizado foram os seguintes:

- I. Caracterização da composição fenólica de amostras de variedades de *Rubus idaeus* L. com expressão em território nacional ao longo de um ciclo produtivo e ao longo de 3 anos consecutivos;
- II. Seleção de uma variedade de framboesa com base no estudo da composição fenólica de cultivares de *Rubus idaeus* L. com expressão em território nacional;
- III. Avaliação *in vitro* de atividades antioxidantes e anti-inflamatórias de um extrato de framboesa;
- IV. Avaliação *in vivo*, em modelos experimentais e em humanos, de atividades antioxidantes e anti-inflamatórias de extratos de framboesa e de framboesas.

Para se atingirem os objetivos propostos o trabalho experimental foi delineado em quatro etapas:

1. Implementação/otimização de metodologias analíticas. Esta etapa do trabalho compreende a comparação de diferentes modos de preparação da amostra, a implementação e/ou otimização de métodos químicos para a determinação do teor em fenóis totais, flavonóides totais, antocianinas totais, taninos hidrolisáveis totais e taninos condensados totais, de técnicas de cromatografia líquida para a análise das diferentes famílias de compostos fenólicos e de testes para avaliação da capacidade antioxidante (ORAC, HORAC e atividade antioxidante intracelular).
2. Realização de estudos com extratos de framboesa para caracterização *in vitro* de efeitos antioxidantes (atividade antioxidante intracelular) e anti-inflamatórios (impacto no *oxidative burst* em neutrófilos humanos).

INTRODUÇÃO

3. Caracterização da composição fenólica de amostras de variedades de *Rubus idaeus* L. (cv. Himbo-top, Amira, Erica e Polka), produzidas no Litoral Alentejano.

4. Realização de estudos *in vivo*:

A. Em animais de laboratório, envolvendo a ingestão de uma dieta suplementada com um extrato de framboesa, visando a avaliação de efeitos anti-inflamatórios em modelos experimentais de inflamação aguda (modelo do edema da pata induzido pela carragenina) e crónica (CIA, modelo de AR induzida pelo CII);

B. Em humanos, compreendendo a suplementação da dieta de voluntários saudáveis com framboesas produzidas no litoral alentejano de modo a avaliarem-se efeitos antioxidantes, mediante a determinação dos indicadores CAO, LDL oxidada, entre outros, e anti-inflamatórios, através do doseamento de biomarcadores de inflamação, nomeadamente das citocinas pró-inflamatórias TNF- α , IL-1 β e IL-6, entre outros.

Os estudos *in vitro* e *in vivo* incluíram a caracterização da composição fenólica, a determinação do conteúdo em vitamina C e a avaliação da capacidade antioxidante dos extratos e frutos de *Rubus idaeus* L. administrados. As amostras usadas nos estudos *in vitro* e *in vivo* incluíram extratos de framboesa e framboesas.

Considerando os objetivos supracitados o trabalho compreende os capítulos seguintes:

Capítulo I – descreve a otimização do método para a preparação dos extratos de framboesa e a caracterização química das amostras de framboesa, frutos frescos de *Rubus idaeus* L. e seus extratos, incluindo a avaliação da composição fenólica e atividade antioxidante *in vitro*, utilizando diferentes metodologias analíticas;

Assim (i) apresentam-se e discutem-se os dados de estudos preliminares que possibilitaram a seleção dos métodos de extração e de técnicas de preparação e de conservação das amostras de *Rubus idaeus* L. e a seleção da cultivar-alvo a usar no estudo de intervenção nutricional em humanos; (ii) procede-se à caracterização química de quatro variedades de *Rubus idaeus* L. em diferentes períodos durante o Outono de 2011; (iii) realiza-se a caracterização química de amostras das quatro cultivares colhidas nos Outonos 2011-2013; (iv) procede-se à caracterização química das amostras utilizadas nos ensaios *in vivo* com animais e no estudo de intervenção em humanos. A caracterização química destas

INTRODUÇÃO

framboesas compreendeu a avaliação da composição fenólica e da atividade antioxidante *in vitro*.

Capítulo II – respeitante à avaliação da atividade biológica de um extrato de framboesa e de framboesas da cultivar-alvo, *in vitro ex vivo* e *in vivo*, no que se refere a potenciais efeitos antioxidantes e anti-inflamatórios.

Assim, (i) são apresentados e discutidos os resultados obtidos nos estudos de avaliação das propriedades antioxidantes intracelulares; (ii) é estudado o efeito anti-inflamatório de um extrato fenólico de framboesa num modelo de inflamação aguda e num modelo de inflamação crónica, ambos realizados em ratos; (iii) são avaliados os resultados do efeito da ingestão crónica de framboesas por humanos, relativamente aos níveis de glicemia, lipidémia, marcadores de oxidação e de inflamação.

Capítulo III – respeitante à apresentação de aspetos a considerar no desenvolvimento de uma alegação de saúde para framboesas.

Assim, (i) são apresentados e discutidos os requisitos legais vigentes e as orientações da EFSA respeitantes à fundamentação científica de alegações de saúde na UE; (ii) são apresentadas alegações de saúde autorizadas suscetíveis de serem usadas por frutos frescos de *Rubus idaeus* L..

Capítulo IV – relativo a conclusões e considerações finais do nosso trabalho no qual tentaremos resumir as conclusões de cada capítulo visando evidenciar a satisfação ou não satisfação dos objetivos específicos do trabalho experimental realizado.

Como previsto na alínea d) do artigo 2.2º do Regulamento de Doutoramento em Farmácia da Faculdade de Farmácia da Universidade de Lisboa (Regulamento nº 799/2015, DR, II Série, Nº 228 de 20 de Novembro de 2015), resultados do trabalho de investigação foram publicados em revistas científicas internacionais e apresentados em encontros científicos internacionais e nacionais.

INTRODUÇÃO

Publicações em revistas internacionais com arbitragem científica:

Bettencourt-Câmara, M; Sepodes, B; Bronze, R; Figueira, ME.
Supplements in the European Union: An Analysis of Health Claims Related to Articular Joint Health. European Journal of Nutrition & Food Safety, ISSN: 2347-5641, Vol.6, Issue.1 (January-March) 2016. doi:10.9734/EJNFS/2016/19031. Disponível on-line em <http://sciencedomain.org/issue/1355>;

Figueira, ME; Câmara, MB; Direito, R; Rocha, J; Serra, AT; Duarte, CM; Fernandes, A; Freitas, M; Fernandes, E; Marques, MC; Bronze, MR; Sepodes, B.
Chemical characterization of a red raspberry fruit extract and evaluation of its pharmacological effects in experimental models of acute inflammation and collagen-induced arthritis. Food Funct. 2014 Dec;5(12):3241-51. doi: 10.1039/c4fo00376d.

Publicações em encontros científicos internacionais e nacionais:

Bettencourt-Câmara M, Bronze MR, Figueira ME. **Comercialização de Alimentos Funcionais na União Europeia: Possibilidades para o desenvolvimento de uma alegação de saúde sobre Framboesas (*Rubus idaeus* L.)**, Décimo Congresso da SPCNA, Porto 15-16/10/2013, Revista SPCNA Alimentação Humana 2013, vol.19, Nº 3, p. 37.

Maria Eduardo Figueira, Ana Ferreira, Madalena Bettencourt Câmara, Elsa Mecha, João Rocha, Maria Rosário Bronze. Protective effect of raspberry in the post prandial metabolic and inflammatory changes. 11º Encontro Química dos Alimentos Bragança 2012

Bettencourt-Câmara, M; Bronze, R; M. Figueira, ME.
Raspberry as a Potential Functional Food: Issues Surrounding Health Claims in Europe. S01.341, Abstracts. Volume II, p. 59, 28th International Horticultural Congress, ICH, organizado pela Associação Portuguesa de Horticultura, Centro de Congressos de Lisboa, dias 21 a 27 de Agosto de 2010.

Capítulo I.

CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DA FRAMBOESA (*Rubus idaeus* L.)

Capítulo I. CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DA FRAMBOESA (*Rubus idaeus* L.)

Os frutos frescos de *Rubus idaeus* L. são pequenos frutos de cor vermelha, ocos, de estrutura frágil, que, regra geral, apresentam um aroma agradável e sabor ligeiramente ácido. A produção de framboesa em Portugal é uma atividade recente que está a assumir grande interesse económico^{22,280,281}. Os frutos frescos produzidos no nosso país destinam-se maioritariamente ao mercado de exportação, sobretudo para os Países Baixos^{23,281}. A garantia de uma boa qualidade constitui um requisito essencial na concretização destas transações comerciais. Para além dos seus atributos sensoriais e relativos à qualidade estes frutos vermelhos têm atraído a atenção de consumidores e de investigadores, sobretudo desde o início do século^{282,283} dada a sua possível contribuição para a manutenção de um estado de saúde, quando o seu consumo é inserido numa dieta saudável.

Os estudos publicados sobre frutos frescos de *Rubus idaeus* L. produzidos em Portugal são recentes^{284,285,286} pelo que o presente trabalho visa dar um contributo para a sua caracterização química, principalmente fenólica.

1. MATERIAL E MÉTODOS

1.1 Reagentes e Padrões

Água desionizada - a água usada na preparação de reagentes e de soluções era água desionizada (tipo I), obtida num sistema de purificação de água ultrapura Milli-Q® Reference/Millipore Direct Q3 UV System (Millipore, Bedford, US) com uma condutividade $\leq 0,058 \mu\text{S}$.

Preparação de extratos de framboesa - metanol absoluto da Carlo Erba Reagents (Sabadell, ES), acetona 99,9%, da Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, US), e ácido fórmico *gradient grade* da VWR Internacional (Carnaxide, PT).

Determinação do conteúdo em Vitamina C - ácido acético glacial, 99%, e acetato de sódio anidro 99%, da Carlo Erba Reagents (Sabadell, ES); ácido metafosfórico, 33,5% - 36,5% da Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, US), hidrogenocarbonato de sódio, 99,5%, Merck S.A. (Algés, PT), sal de sódio de 2,6-diclorofenol-indofenol 90%, da Riedel-de Haën (Seelze,

DE) e xileno, mistura de isômeros de 96% da Labsolve® (Amadora, PT); ácido ascórbico, 99,7%, da Panreac Química (Barcelona, ES);

Doseamento do teor em Fenóis Totais - reagente de Folin-Ciocalteu, carbonato de cálcio anidro 99 % da Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, US); ácido gálico a 98% da Fluka - Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, US);

Doseamento do teor em Flavonóides Totais – (-) catequina a 98%, nitrato de sódio 97% e cloreto de alumínio 99 % da Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, US) e hidróxido de sódio 98% da Merck S.A. (Algés, PT);

Doseamento do teor em Antocianinas Totais - ácido clorídrico 0,1M da Carlo Erba Reagents (Sabadell, ES) e bissulfito de sódio 58,5 % da Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, US); cianidina-3-glucósido \geq 96% da Extrasynthese (Genay, FR);

Doseamento do teor em Taninos Hidrolisáveis - iodeto de potássio a 99,5% da Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, US); ácido tânico puro da BDH-Chemicals, VWR International (Carnaxide, PT);

Determinação do teor em Taninos Condensados - ácido sulfúrico 95-97 % da Fluka, Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, US), metanol absoluto da Carlo Erba Reagents (Sabadell, ES) e vanilina 99% da Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, US);

Determinação do perfil fenólico por cromatografia líquida (HPLC) associada a diferentes modos de detecção – ácido fosfórico p.a. 85% da Panreac Química (Barcelona, ES) e acetonitrilo HPLC *gradient grade* da VWR Internacional (Carnaxide, PT), ácido fórmico *gradient grade* da VWR Internacional (Carnaxide, PT) foram utilizados para a preparação dos eluentes.

Foram preparadas soluções dos seguintes padrões: ácido gálico a 98%, ácido cafeico a 98%, ácido elágico \geq 95%, ácido ferúlico \geq 99,0%, ácido protocatechuico a 97%, ácido salicílico \geq 99,0%, catequina \geq 98% da Fluka da Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, US); canferol-3-glucósido \geq 99%, cianidina-3-glucósido \geq 96%, cianidina-3-rutinósido \geq 96%, quercetina dihidratada \geq 99% e quercetina-3-rutinósido \geq 99% da Extrasynthese (Genay, FR), em metanol *gradient grade* \geq 99,8% da Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, US);

Análise de compostos fenólicos por MALDI-TOF-MSⁿ – ácido 2,5-dihidroxibenzóico da Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, US), etanol absoluto \geq 99,5% da Decon Laboratories Inc.

(King of Prussia, PA, US), metanol da Fisher Scientific (Fair Lawn, NJ, US); Na calibração do equipamento foi usada uma mistura de calibração (Mix 4700) contendo des-Arg-bradicinina (904,468 Da), angiotensina 1 (1.296,685 Da), Glu-Fibrinopéptido B (1.570,677 Da), hormona adrenocorticotrófica (1-17) (2.093,087 Da), e hormona adrenocorticotrófica (18-39) (2.465,199 Da) da Applied Biosystems (ABSciex, FC, US);

Avaliação da Capacidade Antioxidante pelos métodos ORAC e HORAC – ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromano-2-carboxílico, Trolox, ácido cafeico, cloreto de 2,2'-azobis (2-metilamidinopropano) (AAPH), fluoreto de cobalto II (CoF₂) e peróxido de hidrogénio da Sigma-Aldrich (St. Quentin Fallavier, FR); Fluoresceína dissódica da TCI Europe N.V. (Antwerp, BE); solução tampão fosfato pH=7,4; cloreto de sódio da Honeywell Riedel-de Haën (Hanover, DE).

1.2 Amostras

Os frutos de *Rubus idaeus* L. utilizados neste trabalho foram produzidos no Alentejo Litoral, em Odemira, e apresentavam-se sãos, inteiros e maduros. Os frutos colhidos em 2010 eram de uma cultivar desconhecida, foram produzidos na Primavera e cedidos por um produtor local. Em 2011, 2012 e 2013 foram colhidos frutos de *Rubus idaeus* L., das cultivares (cv.) remontantes Himbo-top, Amira, Erica e Polka (Figura I.1). Estas colheitas foram realizadas na Primavera de 2011 (ensaios preliminares) e no Outono, entre Outubro e Dezembro, na HEF, sita no concelho de Odemira, incluída no perímetro do Parque Natural do Sudoeste Alentejano e Costa Vicentina, a uma latitude e longitude de, respetivamente, 37°30'N e 8°45'O, a uma altitude de 106 m e a apenas 4 km do Oceano Atlântico. As quatro variedades consideradas tinham expressão em território nacional na altura em que se delinearam os trabalhos.

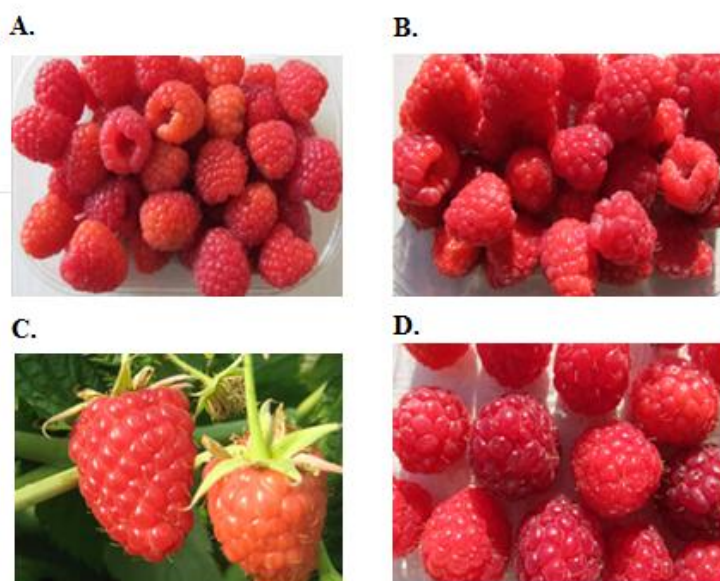


Figura 1.1 – Framboesas das cultivares Himbo-top (A), Amira (B), Erika (C) e Polka (D)

Tabela I.1 - Identificação das amostras de frutos frescos de *Rubus idaeus* L. usadas nos estudos realizados no âmbito da tese

AMOSTRAS (Época de produção, ano, cv.)	ESTUDOS
Framboesas vermelhas da Primavera de 2010 de cv. desconhecida;	Caracterização Química de um extrato de <i>Rubus idaeus</i> L. (item 2.6, cap. I); Estudo da capacidade antioxidante celular (item 1.2.1, cap. II); Avaliação <i>in vitro</i> do <i>oxidative burst</i> pelos neutrófilos (item 1.2.2, cap. II); Estudo da atividade anti-inflamatória, aguda e crónica, <i>in vivo</i> , em modelos animais (item 2, cap. II)
Framboesas vermelhas da Primavera de 2011 de uma das cv. Himbo-top, Amira, Erica e Polka;	Ensaio preliminares relativos à escolha de técnicas de conservação dos frutos frescos, de métodos de extração dos compostos fenólicos (item 2.4, cap. I)
Framboesas vermelhas do Outono de 2011, das cv. Himbo-top, Amira, Erica e Polka;	Seleção da cultivar-alvo do estudo de intervenção nutricional em humanos (item 2.4, cap. I)
Framboesas vermelhas dos Outonos de 2011, 2012 e 2013, das cv. Himbo Top, Amira, Erica e Polka;	Caracterização química de frutos de <i>Rubus idaeus</i> L. de quatro variedades, produzidos em três Outonos consecutivos (item 2.5, cap. I)
Framboesas vermelhas do Outono de 2012, da cv. Amira;	Caracterização química de frutos da cv. Amira usados num estudo de intervenção em humanos (item 2.7, cap. I) Estudo do impacto da ingestão de frutos de <i>Rubus idaeus</i> L. no stresse oxidativo e inflamação pós-prandiais em voluntários saudáveis (item 3, cap. II)

1.3 Preparação dos Extratos de *Rubus idaeus* L.

Foram produzidos dois extratos de framboesa ricos em compostos fenólicos, segundo adaptação dos procedimentos descritos por Mullen *et al.*⁷⁷ e González-Barrio *et al.*⁷⁵ (Figura 1, Apêndice A). Nos dois procedimentos adicionaram-se 90 mL de solução extratante a 40 g de framboesas e procedeu-se do seguinte modo:

Procedimento 1 - nos extratos acidificados de metanol e água $\text{CH}_3\text{OH}:\text{H}_2\text{O}:\text{CH}_2\text{O}_2$, (79,9:20:0,1 v/v/v) homogeneizou-se a mistura durante 1 minuto (homogeneizador Ultra-Turrax T25 Janke & Kunkel, IKA Labortechnik, DE), a 9500 rpm/min, e depois procedeu-se à sua centrifugação, 20 minutos a 7000 r.p.m., à temperatura de 4°C.

Procedimento 2 - nos extratos de metanol e acetona $\text{CH}_3\text{OH}:\text{CH}_3(\text{CO})\text{CH}_3$, (50:50 v/v), a amostra foi macerada manualmente durante 10 minutos, num almofariz arrefecido com gelo, com o auxílio de um pilão.

Em ambos os casos o homogeneizado de framboesas foi centrifugado durante 20 minutos a 7000 r.p.m., à temperatura de 4°C. De seguida, procedeu-se à separação e filtração do sobrenadante. As massas residuais foram sujeitas a uma nova extração com 70 mL de solução extratante e os dois extratos foram misturados. Os extratos obtidos no procedimento 2 foram evaporados num rotavapor à temperatura de 35°C, sob vácuo, até praticamente à secura. De seguida, os extratos evaporados foram reconstituídos com água Milli-Q®, de modo a obterem-se extratos com uma concentração de 5g de framboesa/mL. Finalmente, todos os extratos foram acondicionados em tubos *falcon* de 15mL, congelados à temperatura de -20 °C até ao momento da realização dos ensaios.

1.4 Equipamentos

Os equipamentos utilizados nos ensaios de caracterização química das amostras foram os abaixo indicados:

Preparação de Extratos de *Rubus idaeus* L. – homogeneizador Ultra-Turrax T25 Janke & Kunkel (IKA Labortechnik, DE); centrífuga 5804 R da Eppendorf (Hamburg, DE); rotavapor da Büchi (Meierseggstrasse, CH);

Determinação do teor em Extrato Seco e da Humidade – estufa Selecta P (J.P. Selecta, Barcelona, ES) e exsicadores de vidro borossilicato 3,3;

Determinação dos teores em Fenóis Totais, Flavonóides Totais, Antocianinas Totais, Taninos Hidrolisáveis e Taninos Condensados – concentrador de vácuo Centrivap® (Labconco Corporation, Kansas, US), espectrofotômetros Beckmann DU-70® (Beckmann Instruments, Inc., Fullerton, US) e Perkin Elmer Lambda 25 UV/vis, da Perkin Elmer (Massachusetts, US) e células de vidro com um percurso ótico de 1cm;

Determinação do conteúdo em Vitamina C – centrífuga Sigma, Modelo 2K15 (Sigma, DE), espectrofotómetro UV-vis, Hitachi L-2000 (Hitachi High Technology, JP); células de vidro com um percurso ótico de 1cm;

Determinação do perfil fenólico por HPLC-DAD-ED – HPLC da Surveyor-Thermo Finnigan (San José CA, US) com amostrador automático, equipado com um detetor de díodos (Surveyor-Thermo Finnigan, San José CA, US), e um detetor eletroquímico (Dionex, ED 40), em série. O controlo, aquisição e processamento dos dados do DAD e do eletroquímico foram realizados, respetivamente, com a versão 4,0 do programa informático ChromQuest® (Surveyor-Thermo Finnigan – Surveyor, San Jose, CA, US) e com um conversor analógico/digital, à frequência de 50 Hz, usando o programa 4880 da Unicam.

Análise de compostos fenólicos por HPLC-DAD-MS/MS – HPLC Alliance Waters 2695 (Waters Corporation, Milford, US) com amostrador automático, acoplado a um detetor de fotodíodos (Water 996 PDA, Milford, US) e a um espectrómetro de massa Quattro micro™ API Micromass® (Waters Corporation, Milford, US), equipado com uma fonte de ionização *electrospray* (ESI, abreviatura do inglês ‘Electrospray ionisation’), um analisador do tipo triplo quadrupolo (QqQ, abreviatura do inglês ‘Triple Quadrupole Mass Detector’) e um fotomultiplicador. O programa informático usado na aquisição e processamento dos dados foi o Masslynx, versão 4.1 (Waters Corporation, Milford, US);

Análise de compostos fenólicos por MALDI-TOF MS – Espectrómetros de massa MALDI-TOF/TOF ABSciex, modelo 4800 *plus* (ABSciex, FC, US) e MALDI-TOF/TOF Bruker ULTRAFEX-III (Billerica, MA, US).

Avaliação da Capacidade Antioxidante – métodos ORAC e HORAC: leitor de microplacas de fluorescência FL800 com o programa de controlo dos dados Gen5 da Bio-Tek Instruments (Winooski, VT, US).

1.5 Métodos

1.5.1 Determinação do Extrato Seco e Cálculo da Humidade

O conteúdo em matéria seca ou extrato seco (ES) das framboesas foi determinado pelo método de secagem em estufa, segundo uma adaptação dos métodos descritos por Remberg *et al.*³⁹ e em ‘Guidance on objective tests to determine Quality of fruits and vegetables and dry and dried produce’ da OCDE²⁸⁷. Resumidamente, uma toma de 6 a 7 g de framboesas foi homogeneizada numa cápsula de esmalte com auxílio de uma vareta de vidro. As amostras foram colocadas numa estufa à temperatura de 100°C por 20h, arrefecidas num exsiccador e pesadas. Seguiram-se sucessivas secagens à temperatura de 100°C por 1h, até peso constante.

O teor em extrato seco das amostras foi calculado a partir da expressão seguinte expressão:

$$ES (g.100 g^{-1} FF) = (C-A) / (B-A) \times 100 \text{ (Equação I.1)}$$

Em que, A - peso da cápsula; B - peso da cápsula + peso da amostra fresca
C - peso da cápsula + peso da amostra desidratada; FF – framboesa fresca.

O teor em humidade (H) das amostras foi calculado pela expressão seguinte:

$$H (g/100 g FF) = 100 - ES \quad \text{(Equação I.2)}$$

Em que, H- humidade; ES – extrato seco; FF – framboesa fresca.

As amostras foram analisadas em triplicado e os resultados são apresentados como média \pm desvio-padrão.

1.5.2 Determinação do Teor em Vitamina C

O teor de vitamina C da amostra foi determinado utilizando um método espectrofotométrico, segundo o descrito e validado por Fojo²⁸⁸. Brevemente o método consistiu numa modificação da técnica apresentada na norma portuguesa NP-3030:1985²⁸⁹.

O método realizado envolveu a extração do ácido ascórbico da amostra com uma solução de ácido acético e metafosfórico, a redução do corante, o 2,6 diclorofenol-indofenol, e a extração deste em excesso pelo xileno, seguida de uma leitura espectrofotométrica a 500 nm. Resumidamente, num balão volumétrico de 100 mL adicionaram-se, consoante aplicável, 2 mL de extrato de framboesa concentrado, de metanol e acetona (50:50 v/v) ou 10 g de framboesa congelada a uma solução de ácido metafosfórico a 3 %. Homogeneizou-se manualmente e perfez-se o volume do balão com a solução de ácido metafosfórico a 3 %. Num tubo de centrífuga, adicionaram-se 3 mL da solução anterior contendo a amostra, 3 mL de uma solução tampão de acetato de sódio e de ácido acético glacial e 1 mL da solução corante, uma solução de 2,6 diclorofenol-indofenol. De seguida adicionaram-se 10 mL de xileno à mistura anterior e agitou-se vigorosamente durante 6 segundos. Esta mistura foi depois centrifugada a 3000 g durante 3 minutos, numa centrífuga Sigma, Modelo 2K15 (Sigma, DE) e procedeu-se à leitura da absorvância do sobrenadante, fase orgânica, a 500 nm num espectrofotómetro UV-vis, Hitachi, modelo L-2000 (Hitachi High Technology, JP), utilizando xileno como referência. O volume do corante consumido nesta reação foi obtido por leitura a partir da curva de calibração da absorvância *versus* volume da solução de corante. A curva de calibração do ácido ascórbico foi preparada segundo o procedimento acima descrito, substituindo a amostra pelo padrão, usando uma gama de concentrações que variou de 150-1000 mg de ácido ascórbico/L. O teor de ácido ascórbico da amostra foi expresso em mg de ácido ascórbico em 100 g de framboesas vermelhas frescas e por mL de extrato. As amostras foram analisadas em triplicado e os resultados são apresentados como média \pm desvio-padrão.

1.5.3 Determinação do Teor em Fenóis Totais

O teor em fenóis totais nos extratos de framboesa foi determinado por uma adaptação do método colorimétrico com o reagente de Folin-Ciocalteu²⁹⁰, desenvolvido por Singleton & Rossi²⁹¹. Resumidamente, 3500 μ L de extratos diluídos de acordo com a concentração da amostra foram misturados com 100 μ L de reagente Folin-Ciocalteu. Após 3 min, adicionaram-se 400 μ L de uma solução de carbonato de sódio a 35% e a mistura foi incubada à temperatura ambiente durante 1 hora. Finalmente, procedeu-se à leitura da absorvância das amostras ao c.d.o. de 725 nm, em células de vidro com um percurso ótico

de 1cm, contra um branco preparado com água desionizada. O ácido gálico foi usado como padrão externo. Preparou-se uma solução-mãe com a concentração de 100 µg/mL utilizando com solvente uma solução metanólica a 80%. A partir desta solução, prepararam-se 6 soluções-padrão de ácido gálico em água, com concentrações de 1 a 6 µg/mL, que foram usadas para a calibração. Todas as amostras e soluções-padrão foram preparadas e analisadas em triplicado. Nos diferentes ensaios, só foram consideradas as curvas de calibração que exibiram um coeficiente de determinação $r^2 > 0,99$ e satisfizeram os critérios de ajustamento linear pré-estabelecidos (item 1.6, capítulo I). As amostras foram analisadas em triplicado e os resultados são apresentados como média \pm desvio-padrão. Os resultados foram expressos em mg de equivalentes de ácido gálico/100 g de fruto fresco (mg EAG/100g FF).

O teor em fenóis totais foi também determinado através do cromatograma obtido a 280 nm na análise por HPLC, segundo o procedimento descrito em 1.5.16.1.

1.5.4 Determinação do Teor em Flavonóides Totais

O teor em flavonóides totais dos extratos de framboesa foi determinado pelo método espectrofotométrico com o cloreto de alumínio descrito por Zhishen *et al.*²⁹². Resumidamente, num balão volumétrico de 10 mL adicionou-se 1 mL de extrato diluído com água desionizada segundo a concentração da amostra e 4 mL de água desionizada e homogeneizou-se a mistura. No tempo zero adicionaram-se 300 µL solução de nitrito de sódio a 5%. Após 5 minutos, acrescentaram-se ao balão 300 µL solução de cloreto de alumínio a 10%. Aos 6 minutos adicionaram-se 2 mL de hidróxido de sódio 1M, perfez-se o volume do balão com 2,4 mL de água desionizada e homogeneizou-se. Por fim, efetuou-se a leitura da absorvância da mistura de cor rosa ao c.d.o. de 510 nm em células de vidro com um percurso ótico de 1cm, contra um branco preparado com água desionizada. Neste ensaio usou-se a catequina como padrão externo. Preparou-se uma solução-mãe com uma concentração de 1000 µg/mL, em metanol. A partir desta foram preparados os 5 padrões de catequina usados na calibração, com concentrações de 20 a 100 µg/mL em metanol. As amostras e soluções-padrão foram todas preparadas e analisadas em triplicado. Nos diferentes ensaios, só foram consideradas as curvas de calibração que exibiram um

coeficiente de determinação $r^2 > 0,99$ e satisfizeram os critérios de ajustamento linear pré-estabelecidos (*item 1.6*, capítulo I). As amostras foram analisadas em triplicado e os resultados são apresentados como média \pm desvio-padrão. Os resultados finais foram expressos em mg de equivalente de catequina/ 100 g de fruto fresco, mg EC/100 g FF.

1.5.5 Determinação do Teor em Antocianinas Totais

O teor total de antocianinas foi determinado nos extratos de framboesa, diluídos (1:20) e concentrados, pelo método espectrofotométrico descrito por Stamatakis *et al.*²⁹⁰. Resumidamente, num tubo de ensaio, adicionaram-se 5mL de ácido clorídrico a 2%, 250 μ L de etanol e 250 μ L de amostra diluída de acordo com a concentração do extrato. Pipetaram-se 1,25mL da mistura anterior para dois tubos de ensaio. Num dos tubos de ensaio, dispensaram-se 500 μ L de bissulfito de sódio a 20% (referência) e ao outro tubo de ensaio adicionaram-se 500 μ L de água (amostra). Agitaram-se vigorosamente ambos os tubos num Vórtex. De seguida procedeu-se à incubação dos tubos de ensaio, ao abrigo da luz e à temperatura ambiente, durante 20 minutos. Finalmente, realizou-se a leitura da absorvância da mistura de cor rosa ao c.d.o. de 520 nm em células de vidro com um percurso ótico de 1cm, contra um branco preparado com água desionizada. A cianidina-3-O-glucósido foi usada como padrão externo e o teor total de antocianinas foi quantificado usando uma curva de calibração (10 - 150 μ g/mL). Preparou-se uma solução-mãe com a concentração de 300 μ g/mL a partir da qual se prepararam as 6 soluções-padrão de cianidina-3-O-glucósido que foram usadas para a curva de calibração (10 a 150 μ g/mL). Nos diferentes ensaios, só foram consideradas as curvas de calibração que exibiram um coeficiente de determinação $r^2 > 0,99$ e satisfizeram os critérios de ajustamento linear pré-estabelecidos (*item 1.6*, capítulo I). A absorvância final foi determinada pela diferença entre a absorvância medida de referência e a absorvância medida da amostra. Os resultados foram expressos em miligramas de equivalentes de cianidina-3-O-glucósido por 100 g de frutos frescos e por mL de extrato (mg CGE/100 g FF ou mg CGE/mL de extrato). As amostras foram analisadas em triplicado e os resultados são apresentados como média \pm desvio-padrão.

O teor em antocianinas totais foi também determinado através do cromatograma obtido a 520 nm na análise por HPLC, segundo o procedimento descrito em 1.5.16.1.

1.5.6 Determinação do Teor em Taninos Hidrolisáveis Totais

O teor em taninos hidrolisáveis dos extratos de framboesa foi determinado pelo método espectrofotométrico descrito por Çam & Hisil¹¹⁵. Adicionaram-se 1 mL de extrato diluído com água desionizada (1:2) e 5 mL de uma solução de iodeto de potássio a 2,5% num tubo de ensaio e agitou-se durante 10 segundos. Passados 4 minutos transferiu-se a mistura, exibindo cor avermelhada, para uma célula de vidro com um percurso óptico de 1 cm e procedeu-se à leitura da sua absorvância ao c.d.o. 550 nm, contra um branco preparado com água desionizada. O ácido tânico foi o padrão externo usado neste método. Preparou-se uma solução-mãe de ácido tânico com uma concentração de 5000 µg/mL e, a partir desta, prepararam-se os 6 padrões de ácido tânico (300-1700 µg/mL), usados na construção da reta de calibração. A solução-mãe foi preparada e diluída em metanol. As amostras e soluções-padrão prepararam-se e analisaram-se em triplicado. Nos diferentes ensaios, só foram consideradas as curvas de calibração que exibiram um coeficiente de determinação $r^2 > 0,99$ e satisfizeram os critérios de ajustamento linear pré-estabelecidos (*item 1.6*, capítulo I). As amostras foram analisadas em triplicado e os resultados são apresentados como média \pm desvio-padrão. Os resultados foram expressos em mg de equivalentes de ácido tânico (EAT) por 100g de fruto fresco, mg EAT/100 g FF.

1.5.7 Análise do Teor em Taninos Condensados Totais

O conteúdo em taninos condensados totais dos extratos de frutos de *Rubus idaeus* L. foi determinado pelo método espectrofotométrico da vanilina, segundo o descrito por Çam & Hisil¹¹⁵, com ligeiras modificações. Brevemente, adicionaram-se 5 mL de metanol a 1 mL de extrato de framboesa, previamente concentrado à secura num concentrador de vácuo Centrivap®. A solução obtida foi filtrada por um filtro de membrana de politetrafluoroetileno (PTFE) de 0,45 µm. Seguidamente, adicionaram-se 2,5 mL de vanilina em metanol a 1% e 2,5 mL de ácido sulfúrico em metanol a 25% a uma alíquota de 1 mL deste filtrado. Depois de homogeneizada, a mistura foi mantida em repouso por 15 minutos à temperatura de 30°C, ao abrigo da luz. Finalmente, transferiu-se a mistura, de cor rosada, para uma célula de vidro com um percurso óptico de 1 cm e procedeu-se à leitura da absorvância ao c.d.o. de 500 nm, contra um branco. O branco foi obtido da mistura de 1mL de metanol, em substituição da amostra, com 2,5 mL de vanilina em metanol a 1% e 2,5 mL

de ácido sulfúrico em metanol a 25%. A catequina foi o padrão externo considerado neste ensaio. Preparou-se uma solução-mãe de catequina em metanol com uma concentração de 1000 µg/mL e, a partir desta, obtiveram-se 6 padrões em metanol (10-100 µg/mL), usados na construção da reta de calibração. À semelhança do referido para os métodos espectrofotométricos anteriores, nos diferentes ensaios só foram consideradas as curvas de calibração que exibiram um coeficiente de determinação $r^2 > 0,99$ e satisfizeram os critérios de ajustamento linear pré-estabelecidos (item 1.6, capítulo I). As amostras foram analisadas em triplicado e os resultados são apresentados como média \pm desvio-padrão. Os resultados foram expressos em miligramas de equivalentes de catequina (mg CE) por 100 g de frutos frescos e por mL de extrato, quando aplicável.

1.5.8 Estudo da Composição Fenólica por HPLC

1.5.8.1 HPLC-DAD-ED

O perfil fenólico de amostras de *Rubus idaeus* L. foi analisado num sistema de HPLC Surveyor-Thermo Finnigan. As separações dos compostos fenólicos da framboesa foram realizadas numa coluna de fase reversa Lichrosorb® RP-18 (5µm) LichroCART®, com 250 µm x 4 µm, com uma pré-coluna do mesmo enchimento (Merck Millipore, Merck KGaA, G), mantidas num forno termostaticado à temperatura de 35°C. Amostras de extrato diluído (1:2-1:50) foram injetadas num volume de 20 µL. A fase móvel, bombeada a uma taxa de fluxo de 0,7 mL/min, era constituída pelos eluentes A - água: ácido ortofosfórico (99,9:0,1, v/v) - e B - água: acetonitrilo: ácido ortofosfórico (59,9:40,0:0,1 v/v/v). A Tabela I.2 apresenta o programa de eluentes respeitante a esta análise.

A deteção dos compostos fenólicos no DAD foi realizada entre os c.d.o. 200 nm – 798 nm, a uma velocidade de 1 Hz e uma largura de banda de 5 nm, aos c.d.o. 280, 360 e 520 nm, de acordo com o(s) composto(s) em análise. O detetor eletroquímico estava equipado com um eléctrodo de carbono vítreo e realizou medições de sinal por voltametria integrada na gama de potenciais entre -1,0 V a 1,0 V, com um varrimento no tempo de 1,0 s.

A tentativa de identificação de compostos nas amostras foi realizada comparando os tempos de retenção e os espectros UV/vis obtidos no cromatograma com os dos padrões puros, preparados e analisados nas mesmas condições, ou por sobrecarga da amostra com

soluções de padrões ou ainda por espectrometria de massa. A quantificação de compostos fenólicos foi realizada com recurso a curvas de calibração de padrões (Tabela 5, Anexo A). Nas diferentes análises só foram consideradas curvas de calibração com um coeficiente de determinação $r^2 > 0,99$ e satisfizeram os critérios de ajustamento linear pré-estabelecidos (item 1.6, capítulo I). As amostras foram analisadas em triplicado e os resultados são apresentados como média \pm desvio-padrão.

Tabela I.2 Programa de eluentes usado na análise do perfil fenólico por HPLC-DAD-ED

TEMPO DE ANÁLISE (MIN.)	ELUENTE A [ÁGUA: ÁCIDO ORTOFOSFÓRICO (99,9:0,1, v/v)] (%)	ELUENTE B [ÁGUA: ACETONITRIL: ÁCIDO ORTOFOSFÓRICO (59,9:40,0:0,1, v/v/v)] (%)
0-10	100	0
15	80	20
25	80	20
70	30	70
75	30	70
85	0	100
100	0	100

A área total dos cromatogramas ao c.d.o. de 280 nm foi medida. Preparou-se uma solução-mãe de ácido gálgico em metanol a 80% com uma concentração de 1000 $\mu\text{g/mL}$. A partir desta solução prepararam-se 8 soluções-padrão de ácido gálgico com concentrações de 5 a 200 $\mu\text{g/mL}$. Os resultados foram expressos em mg de equivalentes de ácido gálgico/100 g de fruto fresco (mg EAG/100g FF).

A área total dos cromatogramas ao c.d.o. de 520 nm também foi medida. Preparou-se uma solução-mãe de cianidina-3-glucósido em metanol a 80% com uma concentração de 101 $\mu\text{g/mL}$. Desta solução prepararam-se 8 soluções-padrão de cianidina-3-glucósido em água com concentrações de 4 a 50 $\mu\text{g/mL}$ que foram utilizadas na quantificação das antocianinas. Estes flavonóides foram expressos em equivalentes de cianidina-3-glucósido. Preparou-se uma solução-mãe de cianidina-3-rutinósido em metanol a 80%, com uma concentração de 117 $\mu\text{g/mL}$. A partir desta solução prepararam-se 8 soluções-padrão de

cianidina-3-rutinósido em água, com concentrações de 2 a 25 µg/mL, que foram usadas na elaboração da reta de calibração e doseamento da cianidina 3-rutinósido.

1.5.8.2 HPLC-DAD-MS/MS

Visando a caracterização química das amostras procedeu-se à análise de extratos de frutos de *Rubus idaeus* L. por HPLC-DAD-MS/MS num sistema HPLC Alliance Waters 2695 (item 1.4, capítulo I).

Nestas análises foi usada uma coluna RP-18, Synergi 2.5µm (100 x 2.00mm) MAX-RP (Phenomenex, US), e uma pré-coluna com o mesmo enchimento, à temperatura de 35°C. A fase móvel era constituída pelos eluentes A: solução de ácido fórmico *p.a* (0,5% v/v) em água e B: acetonitrilo, grau LC-MS. O detetor de díodos realizou um varrimento desde 210 a 600 nm. Na análise dos compostos fenólicos por HPLC-DAD-MS/MS foi utilizado um programa cromatográfico de 120 minutos para a caracterização da amostra. Utilizou-se o programa de eluentes apresentados na Tabela I.3. O fluxo empregue foi de 0,3mL/min e as amostras foram injetadas num volume de 20 µL. As condições de análise do espectrómetro de massa para a fonte ESI encontram-se descritas na Tabela I.4. O programa informático usado na aquisição e processamento dos dados foi o Masslynx, versão 4.1. Na quantificação dos compostos detetados usou-se a função Quanlynx.

Tabela I.3 - Programa de eluentes usado na análise dos compostos fenólicos por LC-DAD-MS/MS

TEMPO DE ANÁLISE (min.)	ELUENTE A [ÁCIDO FÓRMICO (0,5% v/v)] (%)	ELUENTE B (ACETONITRIL) (%)
0	95	5
10	95	5
15	85	15
20	80	20
30	80	20
55	70	30
80	50	50
120	10	90

Tabela I.4 – Condições operacionais da fonte ESI no espectrômetro de massa

MODO DE IONIZAÇÃO	Positivo para antocianinas; Negativo para outros compostos fenólicos e ácidos orgânicos.
GÁS DE NEBULIZAÇÃO, DESSOLVATAÇÃO E DE CONE	Azoto
GÁS DE COLISÃO	Árgon
VOLTAGEM DO CAPILAR (kV)	3,00
VOLTAGEM DO CONE (kV)	30
TEMPERATURA DE FONTE (°C)	120
TEMPERATURA DE DESSOLVATAÇÃO (°C)	350
FLUXO DO GÁS NO CONE (L/h)	50
FLUXO DO GÁS DE DESSOLVATAÇÃO (L/h)	750
FOCAGEM DAS LENTES (V)	0,2
ENERGIA DE COLISÃO (eV) usada nos ensaios de fragmentação	20 – 30
MASSAS ADQUIRIDAS (intervalo de valores m/z)	50 – 2000

Numa primeira fase, a análise dos extratos de framboesa compreendeu a realização de um varrimento para valores de m/z compreendidos entre 50 e 2000, no modo MS SCAN, o que permitiu a obtenção do espectro de massa dos compostos. Numa segunda abordagem, realizada no modo de ião simples (SIR), visou-se a pesquisa dos iões precursores que resultaram da ionização de analitos presentes na amostra. Por último, pesquisou-se os iões produto, fragmentos em modo *DaughterScan* (DS), fragmentos dos iões precursores, nos tempos de retenção determinados. Os dados nestes ensaios (t_r , valores de m/z do ião molecular e dos fragmentos obtidos) foram comparados com os disponíveis na bibliografia e com padrões analisados nas mesmas condições.

1.5.8.3 MALDI-TOF-MS

Os compostos fenólicos presentes em extratos de framboesa foram analisados em espectrômetros de massa com analisadores de tempo voo e ionização/dessorção a laser assistida por matriz (MALDI-TOF, do inglês *Matrix-assisted laser desorption/ionization-time-of-flight mass spectrometer*). Nesta análise as amostras são previamente co-cristalizadas com uma matriz orgânica, sendo depois ionizadas por ação do laser.

Um extrato de framboesas foi avaliado no MALDI-TOF/TOF ABSciex, APPLIED BIOSYSTEMS, modelo 4800, do Instituto de Tecnologia Química e Biológica, ITQB (Figura I.2), que apresenta dois analisadores de tempo de voo em paralelo.

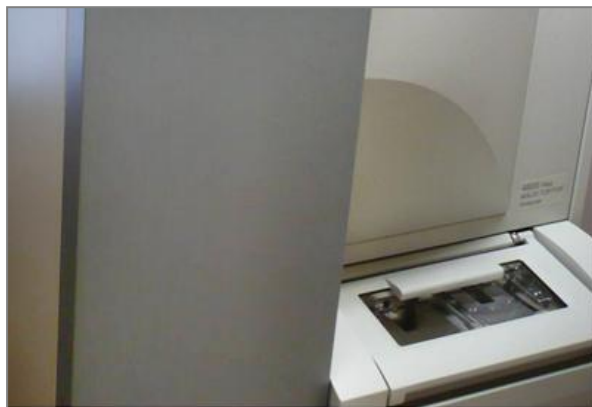


Figura I.2 - Aspeto do MALDI-TOF/TOF ABSciex (Applied Biosystems), modelo 4800, do ITQB.

O extrato foi previamente evaporado à secura, num rotavapor à temperatura de 35°C, sob vácuo, diluído (1:2) com 25 mg/mL de 2',4',6'-Trihidroxiacetofenona monohidrato (THAP) (matriz-solução) em 50% (v/v) de acetonitrilo aquoso contendo 5% (v/v) de ácido fórmico e foi aplicado diretamente em poços distintos da placa MALDI. A mistura amostra-matriz foi seca ao ar. As análises MS foram realizadas nos modos de refletão positivo e negativo, e compreenderam varrimentos para valores de m/z compreendidos entre 200-4000 e 100-2000, respectivamente. O espectrómetro de massa foi calibrado externamente usando des-Arg-bradicinina (904,468 Da), angiotensina 1 (1.296,685 Da), Glu-Fibrinopéptido B (1.570,677 Da), hormona adrenocorticotrófica (1-17) (2.093,087 Da), e hormona adrenocorticotrófica (18-39) (2.465,199 Da) (Calibração Mix 4700, Applied Biosystems). Os espectros MS foram obtidos num modo de aquisição usando geralmente 1000 disparos de laser por espectro e uma intensidade do laser fixa de 3500 V. Os picos m/z de interesse foram selecionados para experiências de MS/MS. As análises de MS/MS foram realizadas utilizando dissociação induzida por colisão (CID), com uma energia de colisão kV e uma pressão de ar de 106 Torr. Os espectros MS/MS obtidos acumularam um total de 2000 disparos de laser/espectro, com uma intensidade do laser fixa de 4500 V. O programa

informático usado no controlo, aquisição e processamento dos dados foi o *software* Série Explorador RC1 4000, versão 3.0 (Applied Biosystems).

O extrato das framboesas usadas no ENIH foi analisado no equipamento MALDI-TOF/TOF Bruker ULTRAFEX-III (Billerica, MA, US), equipado com extração retardada e laser N₂ (337 nm), segundo o método descrito por Feliciano *et al.*²⁹³. Pipetou-se 0,9 mL do extrato para uma coluna Sep-Pak C18 da Waters (5g) (Billerica, MA, US), lavou-se com 20 mL de água Milli-Q® e posteriormente procedeu-se à eluição dos compostos retidos na coluna com 25 mL de metanol a 100%. Seguiu-se uma evaporação num rotavapor à temperatura de 35°C, sob vácuo, até praticamente à secura, seguida de reconstituição com 1,2 mL de metanol 100%. O extrato metanólico obtido apresentava um teor de fenóis totais de 6,02 mg GAE/mL. Pipetou-se 0,498 mL desta solução, evaporou-se numa corrente de azoto, até praticamente à secura, e reconstituiu-se com 0,15 mL de etanol absoluto obtendo-se um extrato final com uma concentração em fenóis totais de 20 mg GAE/mL. Uma alíquota de 0,5 µL deste extrato foi então adicionada com 1µL de ácido 2,5-dihidroxibenzóico (matriz-solução) (50,0 mg/mL em etanol absoluto), e colocada em três poços distintos da placa MALDI. Todas as análises foram realizadas no modo de refletor positivo. Os espetros obtidos corresponderam à soma de diferentes locais em cada poço, acumulando um total de 500 disparos de modo a minimizar-se a variabilidade inter-poço, e a deflexão foi ajustada a 800 Da. O programa informático usado no controlo, aquisição e processamento dos dados foi o FlexControl e o FlexAnalysis (Bruker Daltonik GmbH, Bremen, DE), versão 3,0.

1.5.9 Avaliação da Capacidade de Absorção do Radical Oxigénio (ORAC)

A avaliação da capacidade de absorção do radical oxigénio, ORAC, das amostras de framboesa foi realizado pelo método descrito por Huang *et al.*²⁹⁴, modificado para o leitor de microplacas de fluorescência FL800 da BioTek Instruments (Winooski, VT, US), segundo o descrito por Feliciano *et al.*²⁹⁵. O presente ensaio mede a capacidade das espécies de antioxidantes presentes nos extratos de *Rubus idaeus* L. para inibirem a oxidação da fluoresceína dissódica (FL) catalisada por radicais peróxido (ROO•) gerados pelo cloreto de 2,2'-azobis (2-metilamidinopropano) (AAPH). Usou-se uma mistura de reação constituída por

$1,5 \times 10^{-7}$ mM de FL e $1,9 \times 10^{-1}$ mM de AAPH em 75 mM de tampão fosfato (pH = 7,4) e a amostra diluída no tampão fosfato até ao volume final de 200 μ L. Esta mistura foi colocada numa microplaca de 96 poços, à temperatura de 37 ° C, e a reação foi iniciada com a adição de AAPH. A fluorescência emitida pela forma reduzida da FL foi medida e registada a cada minuto durante 30 minutos, para os comprimentos de onda de emissão $\lambda_{em}=530 \pm 25$ nm e de excitação de $\lambda_{ex}=485 \pm 20$ nm. O leitor de placa foi gerido pelo programa informático de análise de dados Gen5TM da BioTek Instruments (Winooski, VT, US). O tampão fosfato foi usado como branco e cinco soluções de Trolox nas concentrações de, respetivamente, 10, 20, 30, 40 e 50 μ mol/L foram utilizadas como padrões de calibração. As amostras, o branco e os padrões foram todos analisados em sextuplicado. Os valores finais de ORAC, expressos em micromoles de capacidade antioxidante de equivalentes de Trolox por 100 g de fruto fresco (100 μ mol CAET/100 g FF), foram determinados através da equação de regressão entre a concentração de Trolox e a curva correspondente ao decaimento da área da FL.

1.5.10 Avaliação da Capacidade de Resgate do Radical Hidroxilo (HORAC)

A avaliação da capacidade de resgate do radical hidroxilo (\cdot OH) por antioxidantes naturais contidos nos frutos de *Rubus idaeus* L. foi realizada pelo método desenvolvido por Ou *et al.*²⁹⁶, com as modificações introduzidas para o leitor de microplacas de fluorescência FL800, descritas por Serra *et al.*²⁹⁷. O método HORAC avalia a capacidade de prevenção pela amostra do radical hidroxilo gerado por uma reação do tipo de Fenton mediada pelo Co(II), com o fluoreto de cobalto II (CoF₂), usando a FL como a sonda e a curva de decaimento da fluorescência de FL para quantificar o valor HORAC²⁹⁶. A reação de Fenton é uma importante fonte de ROS em sistemas biológicos, na qual o Fe²⁺ ou Fe³⁺ reage com H₂O₂ para produzir ROS como os radicais \cdot OH, O₂⁻ e ¹O₂²⁹⁸.

Em cada ensaio utilizaram-se 200 μ L de uma mistura contendo de 10 μ L da amostra (extratos de framboesa diluídos), 180 μ L de FL (4×10^{-3} μ M) e 10 μ L de CoF₂ (0,79 mg/ mL). A mistura foi colocada num dos 96 poços da microplaca, à temperatura de 37°C. A reação foi iniciada com a adição de 5 μ L H₂O₂ (1.1 M). A fluorescência emitida pela forma reduzida da FL foi medida e registada a cada minuto durante 35 minutos. Na leitura da microplaca usaram-se filtros de fluorescência para os comprimentos de onda de emissão $\lambda_{em}=530 \pm 25$

nm e de excitação de $\lambda_{ex}=485 \pm 20$ nm. Esta leitura foi igualmente assistida pelo programa de análise de dados Gen5TM da BioTek Instruments (Winooski, VT, US).

Neste método usou-se o ácido cafeíco como padrão de calibração, por proporcionar uma gama mais linear em relação à obtida com o ácido gálico²⁹⁷. As amostras, o branco e os padrões foram todos analisados em sextuplicado. Os resultados individuais, expressos em micromoles de capacidade antioxidante de equivalentes de ácido cafeíco (CAEAC) (CAEAC, abreviatura do inglês ‘caffeic acid equivalents antioxidant capacity’) por 100 g de peso fresco de framboesa ($\mu\text{mol CAEAC}/100\text{g FF}$), foram determinados através da equação da reta de calibração que relaciona a concentração de ácido cafeíco e a curva correspondente ao decaimento da área da FL.

1.6 Tratamento dos Resultados

A análise dos dados obtidos pelos métodos cromatográficos foi sempre feita forma idêntica tirando partido das metodologias disponíveis: (i) análise por HPLC-DAD-ED seguida de uma avaliação qualitativa de compostos detetados aos c.d.o. 254 nm (elagitaninos e ácido elágico e derivados), 280 nm (ácidos fenólicos, flavonóis e flavano-3-óis), 360 nm (flavonóis) e 520 nm (antocianinas); (ii) tentativa de identificação de compostos fenólicos separados por HPLC-DAD com base no tempo de retenção (t_r), na ordem de eluição e no espectro UV-vis desses constituintes comparados com os de misturas de padrões puros incluindo compostos potencialmente presentes em framboesas, analisadas na mesma sequência (Tabela I.5) e com dados da bibliografia; (iii) tentativa de identificação/confirmação de compostos fenólicos por análise LC-DAD-MS/MS nos modos Mass Scan (MassS) e Daughter Scan (DS) (iv) quantificação de compostos identificados com base em retas de calibração com padrões puros.

Na quantificação dos diferentes analitos nas amostras foi usado método da reta de calibração. Os dados das calibrações foram tratados pelo método dos mínimos quadrados. As calibrações obtidas foram consideradas aceites sempre que: (1) o coeficiente de determinação $r^2 \geq 0,99$; (2) se verificaram os pressupostos da regressão (distribuição normal dos resíduos, média dos resíduos= zero, o zero não pertence ao intervalo de confiança dos resíduos); (3) a análise gráfica dos resíduos gerados pela regressão linear (avaliada por

inspeção visual) indicava que estes se distribuíam aleatoriamente à volta da reta $x=0$, não apresentando nenhum comportamento regular ou tendência funcional; (4) as representações gráficas de retas de calibração com os mesmos padrões e gama de concentrações, obtidas em momentos distintos eram sobreponíveis.

Tabela I.5 – Análise HPLC-DAD: composição das misturas de padrões puros

Padrões	Tr (min)
Mistura A (100 ppm)	
Ácido Gálgico	11.13
Epicatequina	36.19
Ác. Elágico	53.07
Mistura B (100 ppm)	
Ácido Protocatechuico	16.10
Catequina	23.87
Ácido Cafeico	29.50
Cianidina-3-glucósido	43.90
Ácido Ferúlico	45.43
Mistura C (100 ppm)	
Ácido p-coumárico	23.87
Cianidina-3-rutinósido	46.92
Quercetina-3-glucósido	52.66
Canferol-3-glucósido	56.25
Quercetina	69.49
Canferol	78.60

Tr – tempo de retenção

O tratamento estatístico dos resultados compreendeu, quando aplicável: (i) a determinação da média e do desvio-padrão; (ii) a verificação de pressupostos de aplicação de testes de hipóteses (teste de Shapiro-Wilk para a distribuição normal das variáveis e teste de Levene para a homogeneidade das variâncias); (iii) a comparação de valores médios entre grupos através de uma análise de variância ANOVA de um fator, seguida do teste post-hoc de comparação múltipla de Bonferroni; (iv) a comparação de médias entre grupos pelo teste de Kruskal-Wallis quando os pressupostos da alínea ii) não se verificaram; (v) o cálculo do coeficiente de variação ou desvio padrão relativo para avaliação da variação intra e inter-

genótipos e entre anos nos diferentes parâmetros. Em todos os casos, os valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significantes. A análise estatística foi realizada no *software* SPSS Statistics 22,0 (IBM Inc., SPSS, Chicago, US).

2. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O trabalho desenvolvido no âmbito desta tese pretende avaliar potenciais efeitos antioxidantes e anti-inflamatórios imputáveis à ingestão de compostos fenólicos presentes em framboesas. Tendo em conta estes objetivos, era essencial numa primeira fase do trabalho proceder à caracterização das amostras de framboesa em estudo no que se refere à sua composição fenólica. Assim:

(i) estudou-se o método de extração de compostos fenólicos mais adequado tendo como ponto de partida informação já disponível na bibliografia consultada (ver 2.1);

(ii) procedeu-se á seleção da técnica de preparação e de conservação das amostras, dado que não era possível colher e usar as amostras logo de seguida e é já sabido que estes frutos facilmente se degradam em condições menos adequadas de conservação (ver 2.2);

(iii) procedeu-se à análise de 4 cultivares em diferentes períodos de produção durante o Outono de 2011 com o objetivo de avaliar a variabilidade da sua composição ao longo do tempo de colheita e de selecionar uma cultivar de framboesa para um estudo em humanos (ver 2.4);

(iv) foram caracterizadas amostras das 4 cultivares produzidas em três Outonos consecutivos de modo a avaliar a variabilidade da sua composição fenólica (ver 2.5);

(v) procedeu-se à caraterização química das amostras utilizadas nos ensaios *in vivo* com animais e no estudo de intervenção em humanos (ver 2.3, 2.6 e 2.7).

2.1 Otimização do Método para Preparação de Extratos

O conteúdo em compostos fenólicos presentes em extratos de frutos de *Rubus idaeus* L. pode variar consideravelmente com o método de extração adotado^{74,83}. Assim avaliou-se a eficácia das extrações sólido-líquido de compostos fenólicos de uma mesma amostra de *Rubus idaeus* L. utilizando dois sistemas de extratantes constituídos por metanol:água:ácido fórmico, (79,1:20:0,1 v/v/v) e metanol:acetona (50:50 v/v), segundo os procedimentos descritos anteriormente (*item 1*, Apêndice A). O sistema extratante constituído por metanol

aquoso acidificado é frequentemente usado^{75,44,67}. O metanol é um solvente orgânico que destrói as membranas celulares e permite a fácil dissolução de compostos fenólicos, nomeadamente antocianinas, componentes importantes deste fruto. O ácido fórmico^{8,73,75} tem sido usado na acidificação da mistura solvente e cria condições favoráveis à estabilização das antocianinas através da formação de sais de cloreto flavílio. Este ácido é frequentemente usado como aditivo de fases móveis em análise por HPLC de fase reversa²⁹⁹ e em HPLC hifenada com espectrometria de massa^{300,301}. A mistura acetona e água é também um sistema muito usado na extração de compostos fenólicos da framboesa^{45,48}.

Para avaliar a eficácia das soluções extratantes foram determinados os teores em fenóis e em flavonóides totais dos extratos preparados nas diferentes condições. A Tabela I.6 apresenta os teores médios e o desvio padrão correspondente à sua análise nos extratos de framboesa obtidos.

Os resultados obtidos para os dois sistemas extratantes testados mostram (Tabela I.6) que a mistura extratante metanol:água:ácido fórmico (79,9:20:0,1 v/v/v) permitiu a obtenção de extratos mais concentrados e as diferenças observadas apresentam significância estatística ($p < 0,05$). Os dados do teor em fenóis totais estão dentro da gama de valores descritos na bibliografia e os relativos ao teor em flavonóides totais estão incluídos na gama de valores descritos para extratos de framboesa metanólicos acidificados com ácido clorídrico^{65,69,74,301}. A grande variabilidade nos resultados descritos na bibliografia pode ser atribuída ao genótipo, condições edafo-climáticas, práticas culturais, condições de conservação e de armazenamento dos frutos frescos, entre outros fatores. No entanto, os elevados teores em fenóis totais de extratos metanol:ác. clorídrico (96:4 v/v) de variedades de framboesas reportados por Sariburun *et al.*⁷⁴ não são consentâneos com os de flavonóides totais referidos no mesmo trabalho. De facto, sendo a framboesa abundante em flavonóides e considerando os resultados obtidos neste estudo e os dados publicados na bibliografia (Tabela I.6) não parece provável que extratos de frutos de *Rubus idaeus* L. apresentem teores em flavonóides entre apenas 25,3 e 41,1 mg EC/100g FF e elevados teores de fenóis totais, entre 1787,3 e 2062,3 mg EAG/100g FF, tendo possivelmente ocorrido um erro no cálculo destes últimos.

Tabela I.6 – Teores em fenóis e flavonóides totais (média \pm DP) presentes nos extratos metanol:água:ácido fórmico (79,9:20:0,1 v/v/v) e metanol:acetona (50:50 v/v) de frutos de *Rubus idaeus* L. e dados da bibliografia

EXTRATO ^(ref)	PARÂMETRO	FENÓIS TOTAIS (mg EAG/100g FF)	FLAVONÓIDES TOTAIS (mg EC/100g FF)
Metanol: água: ác. fórmico (79,9:20:0,1 v/v/v)		234,2 ^a \pm 1,14	29,5 ^a \pm 0,74
Metanol: acetona (50:50 v/v)		154,1 ^b \pm 0,50	21,1 ^b \pm 0,10
DADOS DA BIBLIOGRAFIA:			
Metanol: água: ác. clorídrico (79,9:20:0,1 v/v/v) ⁶⁵		57,5	—
Metanol: ác. clorídrico (96:4 v/v) ⁷⁴		1787,3 - 2062,3	25,3 – 41,1
Metanol: ác. clorídrico (99,9:0,1 v/v) ⁶⁹		215,5 - 326,7	118,8 – 279,3
Metanol: água: ác. fórmico (60:39:1 v/v/v) ⁴⁴		216,9 - 233,9	—
Metanol: água (50:50 v/v) ⁶²		192 - 340	—
Metanol: água: ác. clorídrico (48:48:4 v/v/v) ⁴¹		113,7 - 177,6	—
Acetona: água: ác. acético (70:29,5:0,5 v/v/v) ³⁷		162,0	—
Acetona: água (80:20 v/v) ⁶⁸		427,5 - 512,7	84,2 – 103,4

Os valores da mesma linha com letras distintas indicam uma diferença significativa ($p < 0,05$) entre os extratos. Os resultados obtidos são a média de 3 extratos, cada um analisado em triplicado. DP – desvio-padrão; EAG – equivalentes de ácido gálico; EC – equivalentes de (+) – catequina; FF – framboesas frescas; — parâmetro não analisado.

Não foram encontrados na bibliografia resultados para extratos de framboesa preparados com a mistura extratante metanol:acetona (50:50 v/v). Os extratos metanol:acetona (50:50 v/v) preparados no âmbito desta tese apresentam um teor em fenóis e em flavonóides totais inferior ao reportado por Tosun *et al.*³⁷ e Liu *et al.*⁶⁸ para extratos de framboesa que utilizam a acetona (Tabela I.6). A mistura extratante acetona: água (80:20 v/v) foi a que possibilitou um extrato mais abundante em fenóis e flavonóides totais. No entanto, como este trabalho visa estudar os compostos fenólicos majoritários da framboesa, nomeadamente antocianinas, optou-se, sempre que viável, pela mistura metanol acidificado com ácido fórmico (79,9:20:0,1 v/v/v). Nos estudos da avaliação da atividade biológica da framboesa em modelos celulares e animais, dada a toxicidade do ácido fórmico, utilizou-se a mistura metanol:acetona (50:50 v/v).

2.2 Escolha do Método de Conservação de Amostras de framboesa

As framboesas são frutos que mantêm taxas de respiração e de transpiração elevadas após a colheita³⁰². Consequentemente alteram-se com facilidade, nomeadamente no que se refere à firmeza, resistência mecânica e suscetibilidade ao desenvolvimento de bolores^{303,304}. A congelação dos frutos recém-colhidos e a sua conservação a cerca de - 20°C são práticas que possibilitam um aumento do seu tempo de vida útil e a preservação da sua composição química, nomeadamente fenólica⁹⁶. O processo de congelação pode promover a rutura de paredes celulares, resultado da cristalização da água, e a armazenagem congelada pode implicar perdas de humidade³⁰².

Visando a conservação de amostras por um período superior a 1 mês e tendo em conta o estudo dos compostos fenólicos, no presente trabalho comparámos a conservação sob refrigeração (a 4°C) com a congelação precedida ou não de tratamento com azoto líquido. Assim, três amostras de framboesas frescas da mesma cultivar, do mesmo lote, foram sujeitas aos diferentes tratamentos. Foi determinado o teor em humidade dos frutos e o conteúdo em fenóis totais e flavonóides totais. Os resultados obtidos são expressos como valores médios \pm desvio padrão, e dados da bibliografia apresentam-se na Tabela I.7.

Tabela I.7 - Teores em humidade, fenóis totais e flavonóides totais (média \pm DP) em extratos metanol: água: ácido fórmico (79,9:20:0,1 v/v/v), obtidos a partir de frutos *Rubus idaeus* L. conservados em diferentes condições e dados da bibliografia

PARÂMETRO Dados da Bibliografia ^{ref}	Framboesas Frescas Refrigeradas	Framboesas Recém-Congeladas	Framboesas Recém-Congeladas em Azoto Líquido
Humidade (g/100g FF; n=4)	87,4 \pm 0,3 ^a -	87,8 \pm 0,2 ^a -	87,7 \pm 0,1 ^a -
Fenóis Totais (mg EAG/100g FF; n=9)	242,9 \pm 1,5 ^a 3510 ⁶⁵ ; 113,7-177,6 ⁴¹	250,8 \pm 1,4 ^b -	218,6 \pm 1,1 ^c 3321 ⁶⁵ ; 99,6 – 187,5 ⁴¹
Flavonóides Totais (mg EC/100g FF ; n=9)	33,6 \pm 0,2 ^a -	32,9 \pm 0,3 ^b -	29,1 \pm 0,8 ^c -

Os valores da mesma linha com letras distintas indicam uma diferença significativa ($p < 0,05$) entre as técnicas de conservação; Os dados da bibliografia com as respetivas referências bibliográficas apresentam-se a cinzento; DP – desvio-padrão; EAG – equivalentes de ácido gálico; EC – equivalentes de (+) – catequina; n – n° de observações.

Os resultados obtidos indicam que a humidade nas diferentes amostras não apresenta diferenças estatisticamente significativas ($p > 0,05$). Pelo contrário os teores em fenóis totais e flavonóides totais apresentam diferenças estatisticamente significativas para os diferentes processos utilizados ($p < 0,05$). Os extratos das framboesas preparados com azoto líquido, apresentaram teores em fenóis e em flavonóides totais inferiores aos determinados nas amostras sujeitas aos outros modos de preparação e conservação.

Não foram encontrados dados na bibliografia relativos ao impacto da congelação doméstica no teor em fenóis e flavonóides totais das framboesas. Os resultados publicados referem-se ao processo de congelação industrial. Mullen *et al.*⁶⁵ avaliaram os efeitos da congelação industrial e refrigeração a 4°C durante 3 dias no mesmo tipo de amostras. As diferenças entre os resultados obtidos não apresentaram significado estatístico, ainda que o teor em fenóis totais dos frutos recém-congelados apresentasse um decréscimo de cerca 5% em comparação com o dos frutos frescos refrigerados⁶⁵. De Ancos *et al.*⁴¹ estudaram o efeito da congelação com azoto líquido em framboesas de quatro cultivares. Os resultados deste estudo evidenciaram comportamentos diferentes consoante a cultivar: em duas cultivares o teor em fenóis sofreu um decréscimo após congelação com azoto líquido (-10 a -12%); nas outras duas, pelo contrário, os frutos congelados apresentaram um teor em fenóis totais aumentado (+6 a +12%) em comparação com o dos frutos frescos. Não foram encontrados na bibliografia resultados relativos à variação do conteúdo em flavonóides totais.

Os dados deste estudo conduziram à escolha do processo de congelação dos frutos inteiros de *Rubus idaeus* L. como método de conservação das amostras de framboesas.

2.3 Identificação de compostos fenólicos num Extrato de *Rubus idaeus* L. por Espectrometria de Massa

Embora a composição fenólica da framboesa possa variar com inúmeros fatores, como já foi anteriormente referido neste trabalho, essas variações normalmente revestem-se da maior importância do ponto de vista quantitativo e menos na composição qualitativa.

Nesta parte do trabalho são apresentados resultados da caracterização química de extratos de framboesa por espectrometria de massa utilizando equipamentos com diferentes

características. Esta caracterização permitiu identificar alguns dos compostos que vão ser usados na caracterização das amostras nos ensaios seguintes.

Entre os diferentes componentes que caracterizam um equipamento de espectrometria de massa, a escolha da fonte de ionização e do detetor reveste-se da maior importância. Assim no presente trabalho utilizou-se uma fonte MALDI (ionização e dessorção a laser assistida por matriz) e de ESI (eletrospray). São ambas técnicas de ionização brandas, permitindo a MALDI a análise de biomoléculas e grandes moléculas orgânicas que são muitas vezes frágeis e que por essa razão se fragmentam quando são ionizadas por outros métodos de ionização. A fonte de eletrospray é uma das mais usadas em espectrometria de massa. A utilização de analisadores diferentes (triplo quadrupolo e tempo de voo) permitiu trabalhar numa gama diferente de aquisição de valores de m/z , sendo mais alargada para o equipamento de TOF permitindo obter informação complementar.

2.3.1 Análise em equipamentos do tipo MALDI-TOF

A complexidade das amostras naturais leva muitas vezes à utilização de metodologias separativas para simplificação da amostra e maior facilidade de identificação e quantificação dos seus componentes. No entanto estas metodologias podem ser relativamente morosas e como tal haverá todo o interesse, com vista a um *screening* rápido de amostras, em utilizar metodologias que rapidamente permitam ter uma ideia da sua composição química.

Neste trabalho de identificação foram usados dois equipamentos de MALDI-TOF diferentes (de acordo com o descrito na parte experimental desta tese, *itens* 1.4 e 1.5.14.3, capítulo I). Pretendia-se obter o máximo de informação relativamente à identificação dos compostos nesta matriz.

Nas Figuras I.3 A e B apresentam-se a título ilustrativo um espectro de massa obtido em modo refletor positivo e negativo na gama de m/z entre 100 e 2000 e nas Tabelas I.8 A e B apresentam-se os valores de m/z detetados em modo negativo e positivo, bem como os iões produto resultantes da fragmentação do ião precursor. Na tabela é feita a identificação de alguns dos compostos com base na comparação entre os dados experimentais obtidos e dados disponíveis na bibliografia.

Foram identificados diversos compostos fenólicos, sobretudo antocianinas e elagitaninos. Para além das antocianinas habitualmente referidas para frutos de *Rubus idaeus* L. maduros, derivadas da cianidina e da pelargonidina, foram detetadas antocianinas derivadas da delfinidina, peonidina e petunidina. Heyman *et al.*³⁰⁵, num estudo recente, identificaram delfinina-3-rutinósido, petunidina-3-rutinósido e peonidina-3 rutinósido em framboesas produzidas na Suécia. No entanto, não foram encontradas referências bibliográficas para as antocianinas delfinidina pentósido, delfinidina glucósido ou delfinidina galactósido, piranopeonidina glucósido e piranopetunidina glucósido possivelmente identificadas no extrato de framboesas analisado (Tabela I.8).

Foram igualmente detetados um flavonol derivado da isoramnetina, ácido quínico e um derivado deste e do ácido cafeíco. Donno *et al.*³⁰⁶ identificou ácido quínico em gomos de framboesas de diversos genótipos, incluindo as cv. Himbo-top e Amira. Não encontrámos dados na bibliografia respeitantes à presença deste ácido orgânico em framboesas maduras.

A) Modo refletor negativo

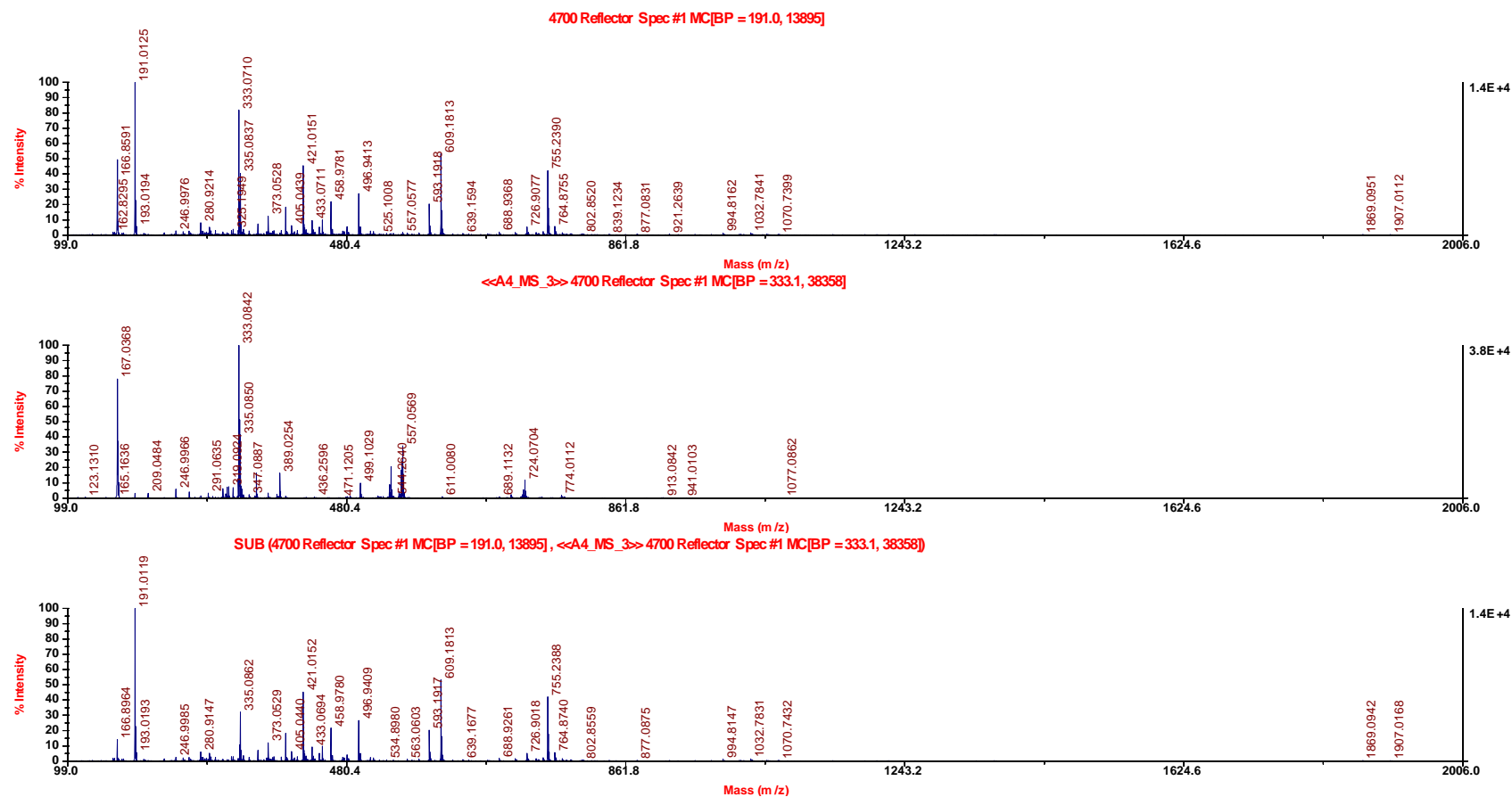


Figura I.3 A – Espectros de massa obtidos em modo refletor negativo na gama de m/z 100 - 2000

B) Modo refletor positivo

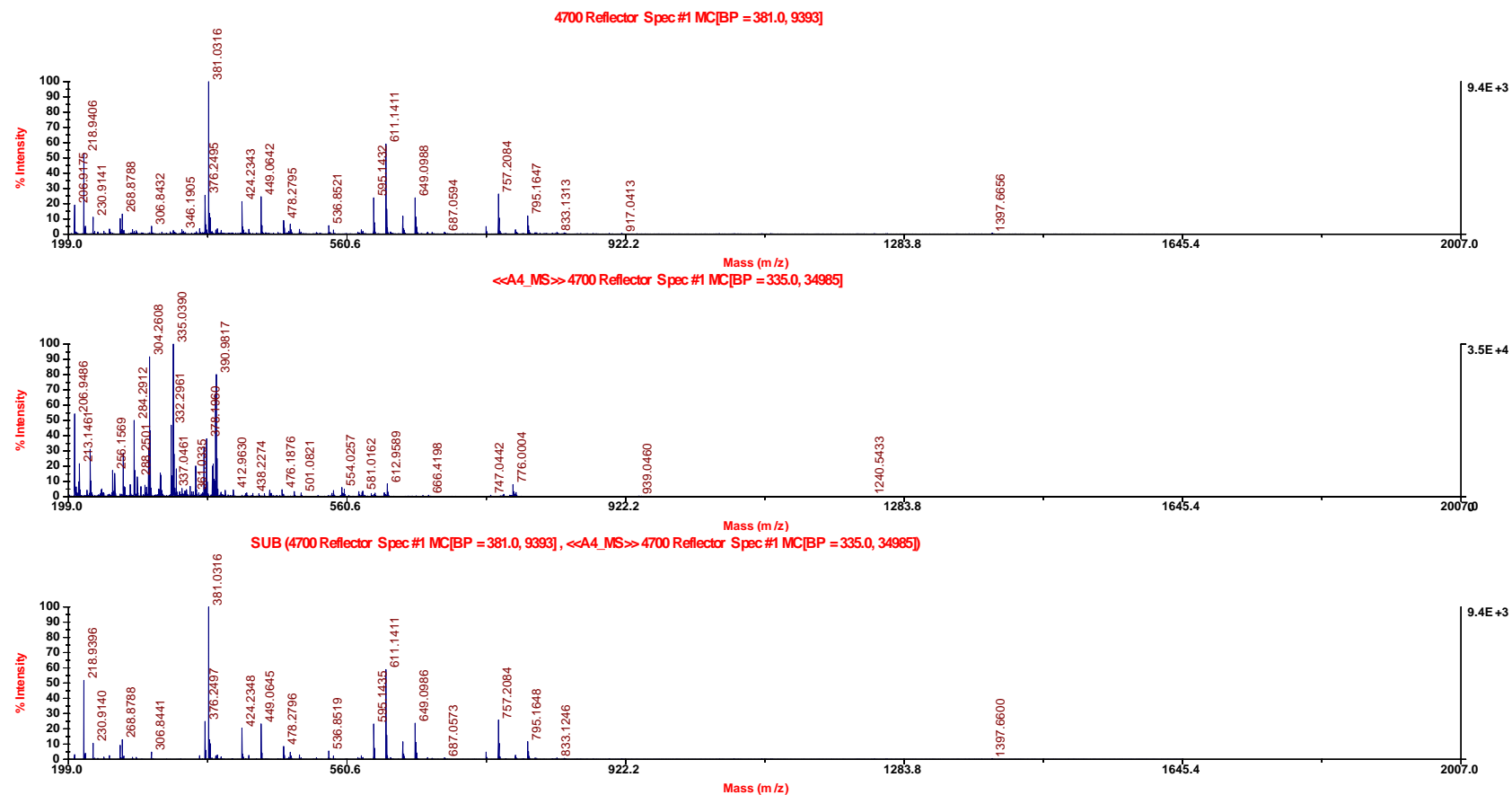


Figura I.3 B – Espectros de massa obtidos em modo refletor positivo na gama de m/z 100 - 2000

Tabela I.8 – Análise de um extrato de framboesa por MALDI-TOF nos modos refletor negativo (A) e positivo (B): íons precursor, íons produto, tentativa de identificação

A. MODO REFLETRÃO NEGATIVO			
Íon precursor (<i>m/z</i>)	Íons produto (<i>m/z</i>)	Identificação provável	Referências
191	191 173 111	ác. cítrico/ ác. quínico	307/308,309
301	301 291 271 133	ác. elágico	77
367	367 210 167	n.i.	
373	367 167 111	n.i.	
373	373 275 167 125		
381	191 289 213 173 111 367	n.i.	
397	397 305 229 191 167 111	n.i.	
421	191	n.i.	
421	421 315 191 167		
421	191315 237 167		
433	433	derivado de ác. elágico	77,81,308
469	469 301 191	derivado de ác. elágico	310
477	477 300 191 137	quercetina-3-glucurônido ou pentose do ácido metil elágico	77,81,308
480	301 175 151	derivado de ác. elágico.	9
480	301 191 167		
515	515 497 346	ácido dicafeoilquínico	311
577	407 371 233	n.i.	
609	609 339 284 429	derivado do canferol*	
726	556 535 497 191	n.i.	
755	755 648 339 284 191	derivado do canferol*	
1205	593 755 609	n.i.	
1221	609 284	derivado do canferol*	
1367	755 609	derivado do canferol*	
1367	755 818	derivado do canferol*	
B. MODO REFLETRÃO POSITIVO			
Íon precursor (<i>m/z</i>)	Íons produto (<i>m/z</i>)	Identificação provável	Referências
218	39 199 187 159 171	n.i.	
	200 187 176 159 139 39		
	39 157 97 62		
	203		
	199 187 171 159		
230	39 212 200 182 170	n.i.	
244	39 225 181 151 104	n.i.	
252	39 241 233 224 207 189 136 104 97	n.i.	
258	39 197 167 149 124 104 60	n.i.	
268	39 259 248 222 207 136	n.i.	
	104 222 211 183	n.i.	
218	39 199 187 159 171	n.i.	
	200 187 176 159 139 39		
	39 157 97 62	n.i.	
	203		
	199 187 171 159		

B. MODO REFLETRÃO POSITIVO (cont.)			
Ião precursor (<i>m/z</i>)	Iões produto (<i>m/z</i>)	Identificação provável	Referências
230	39 212 200 182 170	n.i.	
244	39 225 181 151 104	n.i.	
252	39 241 233 224 207 189 136 104 97	n.i.	
258	39 197 167 149 124 104 60	n.i.	
268	39 259 248 222 207 136	n.i.	
	104 222 211 183		
	39 241 217 211 104		
	39 249 223 211 165 104		
	223 165		
	39 269 241 221 152 60 43		
287	287	cianidina	44,73,107
296	237 287 277 253 223	derivado de cianidina	
306	91 287 246 212 203 58 34	derivado de cianidina	
	91 285 212 58 39		
	91 296 286 247 212 203		
	287 247 219 203		
348	307 329 223	n.i.	
365	203 345 321 262 223 185	n.i.	
381	39 356 333 223 219	n.i.	
	39 201		
	39 201 223		
	39 344 201		
	39 345 243 201		
383	39 219	n.i.	
410	39 367 285 243 203	n.i.	
	39 203 219 285 337 349 391		
424	39 402 347 297 237	n.i.	
433	39 391 311 251 157	pelargonidina 3-glucósido ou galactósido	312-314
435	303 271 253 245 203	delfinidina pentósido	312
449	287 322 202	n.i.	
449	39 287 271 203	n.i.	
	287	cianidina-3-glucósido ou galactósido	73,81,107,301,310,312
465	303 445 329 287	delfinidina glucósido ou galactósido	
	301 445 303	n.i.	
479	303 345 219	derivado delfinidina	
	39 459 309 303 287 219	n.i.	
487	39 325 293	piranopeonidina glucósido	313
	39 469 403 383 293 251		
498	307 269 203 184	n.i.	
503	307 481 439 411 269	n.i.	
517	39 445 441 309 271	n.i.	
520	445 497 427 411 364 348	n.i.	
	39 445 341 215		
	445 505 417 329 291		
536	307 518 386 345 469	n.i.	
	307 386 345 264 203		
574	471 513 424 408 345 307 259 203	n.i.	

B. MODO REFLETRÃO POSITIVO (cont.)				
Ião precursor (m/z) <small>(nº composto)</small>	Iões produto (m/z)	Identificação provável	Referências	
579	471 557 513 345 307 285 247 39	pelargonidina-3-rutinósido	312,314	
	445 513 471 345 307 259			
	39 473 347 309 203			
595	271 433 344 306 203 39	pelargonidina-3-soforósido e cianidina-3-rutinósido	81,312,313	
	287 271 85 39			
	287 271 219 449 440 424			
611	271 441 425 287	cianidina-3-soforósido	107,271,301,312,313	
	39 493 449 428 303 287 271 253			
	287 441			
620	287	n.i.	107,271,301,312,313	
	287 575 269			
	39 595 504 325 311 295 287			
633	39 611 527 465 347 309 287	n.i.		
	39 347 309 201			
	39 597 347 309 291			
635	39 466 311 245 201	n.i.		
	39 611 325 311			
	39 287			
649	38 613 591 363 325	piranopetunidina coumaroilglucósido	313	
	39 363 325			
	39 469 347 325 307			
665	39 613 363 325 307	n.i.		
	39 613 347 325			
	39 363 325			
679	39 542 363 340	n.i.		
	542 524 503 428 363 325 287			
	39 325 377 386 508 649			
717	39 685 583 415 379 345 269	n.i.	81,312	
727	287 581 401 271	cianidina-3-xilosilrutinósido		
	403 287 39			
	287 669 581 536 495 433 271 184 39			
736	39 306 287 184 142	n.i.	314	
741	271 595 417	pelargonidina-3-glucosilrutinósido		
	271 595 417 163 85 39			
	39 571 419 271			
743	595 417 271	cianidina-3-sambubiósido-glucósido		
	419 581 271 287			
	271 595 417 287			
750	271 559 309 138 39	n.i.	314	
752	559 583 559 296 287 271 184 138 39	n.i.		
757	287 611 433 184 85 39	cianidina-3-soforósido-5-ramnósido		
	287 611 433 85			73,107,271,301,310,312
	287 611 565 433 184 39			
	287 611 433 184 85 39			

B. MODO REFLETRÃO POSITIVO (cont.)			
Ião precursor (m/z) (nº composto)	Iões produto (m/z)	Identificação provável	Referências
	287 565 433 287 184		
	287 611 433		
766	287 741 574 475 433 325 203	n.i.	
795	39 509 325 184 86	n.i.	
	39 757 509 325		
	39 509 325		
	39 603 471 325 296		
	39 509 325		
804	39 757 613 575 509 325 287 184	n.i.	
	39 639 613 575 475		
	39 757 635 613 575 325 269 203		
811	39 751 706 641 619 583 509	n.i.	
	39 749 707 619 510		
	39 749 709 643 583 339		
826	659 765 723 659 635 597 478 355 203	n.i.	
828	39 635 599 478 355 307 203	n.i.	
	39 479 307 184 795 765 723 635		
833	39 731 663 599	n.i.	
842	651 781 739 613 575 306 259 203	n.i.	
	39 781 739 667 651 613 499 370 285		
	203 184		
	39 651 613 575 499 461 636 307		
	259 203		

n.i. – não identificado; m/z a vermelho - iões do pico base; * precisa ser confirmado.

Nas condições usadas no equipamento (Bruker ULTRAFLEX_III MALDI TOF/TOF mass spectrometer (Billerica, MA, USA)) foram ainda identificados os seguintes compostos (Figura I.4): m/z 511.39 isoramnetina-3-glucoronídeo; m/z 535.22, cianidina-3-malonil-glucósido; m/z 581.15, cianidina-3-sambubiósido; m/z 597.17, cianidina-3-rutinósido/pelargonidina-3,5-diglucósido; m/z 736.50, epi(cat)-cianidina-3-glucósido; 757.17, cianidina-3-glucosil-rutinósido; m/z 959.08, casuarictina; m/z 1127.02, sanguina H-2; m/z 1590.97, sanguina H-10; (C) m/z 1829.97, sanguina H-6; m/z 2828.27, lambertianina C.

Para muitos dos valores m/z detetados não foi possível proceder-se a uma identificação da molécula em causa. Esta é uma situação que ocorre frequentemente neste tipo de análise, decorrente da escassez de bases de dados e das muitas possibilidades de identificação.

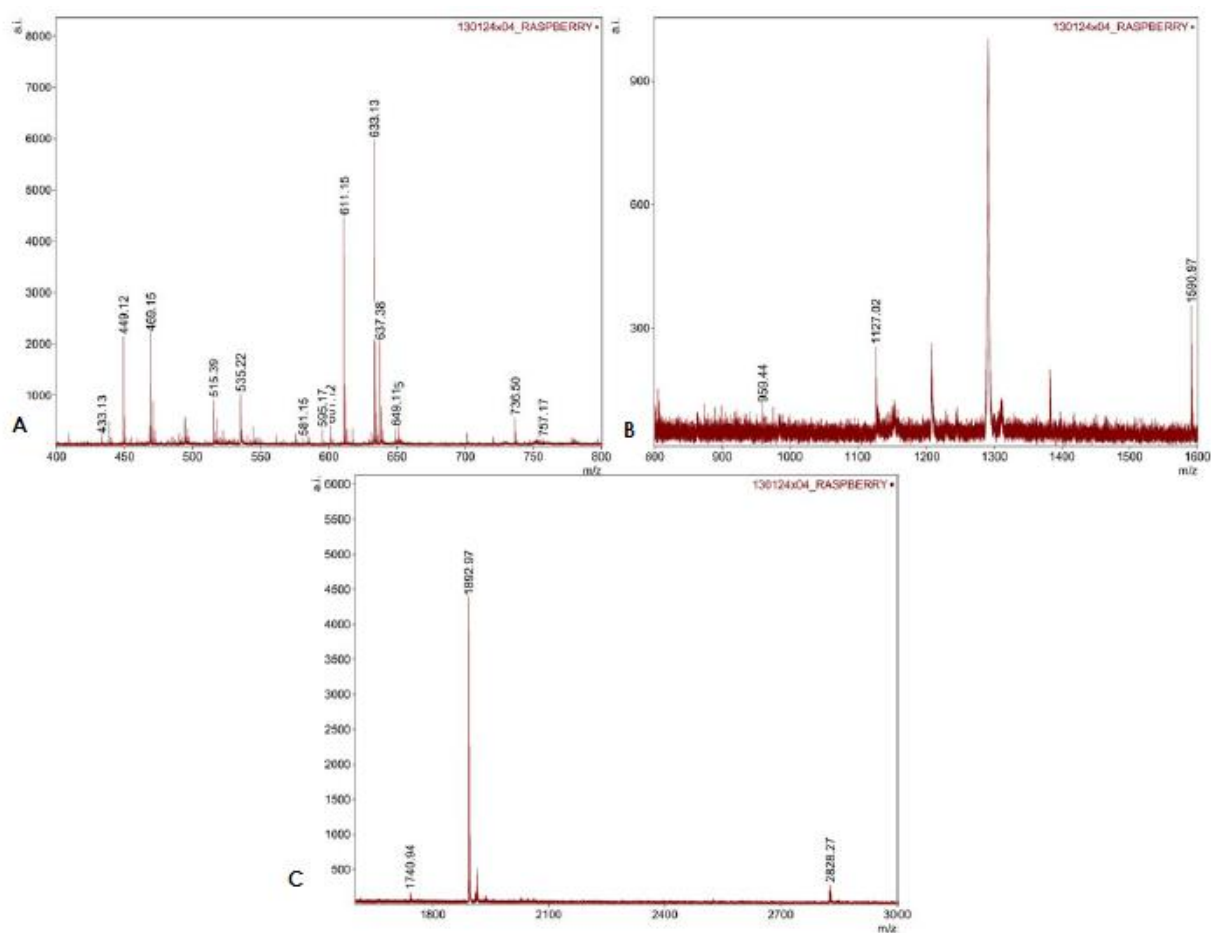


Figura I.4 - Espetros MALDI-TOF/TOF MS (A, B e C) do extrato metanólico aquoso, acidificado com ác. fórmico (79,9:20:0,1 v/v/v) de framboesas da cv. Amira usada no ENIH.

2.3.2 Análise por HPLC-MS/MS num equipamento do tipo triplo quadrupolo

Na análise por HPLC-DAD-MS/MS dos extratos metanol:água:ácido fórmico (79,9:20:0,1 v/v/v) da amostra de framboesa efetuou-se um varrimento (modo MS SCAN) para valores de m/z compreendidos ente 50 e 2000 (Figura I.5). Relativamente às condições de análise, as antocianinas foram analisados por ionização na fonte de electrospray (ESI) em modo positivo enquanto que os restantes compostos apresentavam condições mais favoráveis de ionização em modo negativo. A utilização de dois modos de deteção (vetor de díodos e espectrometria de massa) possibilitou a caracterização do composto em termos do seu espectro de absorção e também do espectro de massa. Pesquisaram-se os iões produto (modo DS) e com base nesses iões houve uma tentativa de identificação dos compostos. A informação obtida (t_r , valores de m/z do ião precursor e dos iões produto) foi comparada com os disponíveis na bibliografia e com padrões comerciais, quando disponíveis. Na Tabela I.9 apresenta-se a lista de compostos identificados que são essencialmente flavonóides (flavanóis e flavonóis, antocianinas), e não flavonóides como os ácidos hidroxicinâmicos e hidroxibenzóicos, taninos hidrolisáveis tendo já sido reportados na bibliografia^{8,75,103,38,107}.

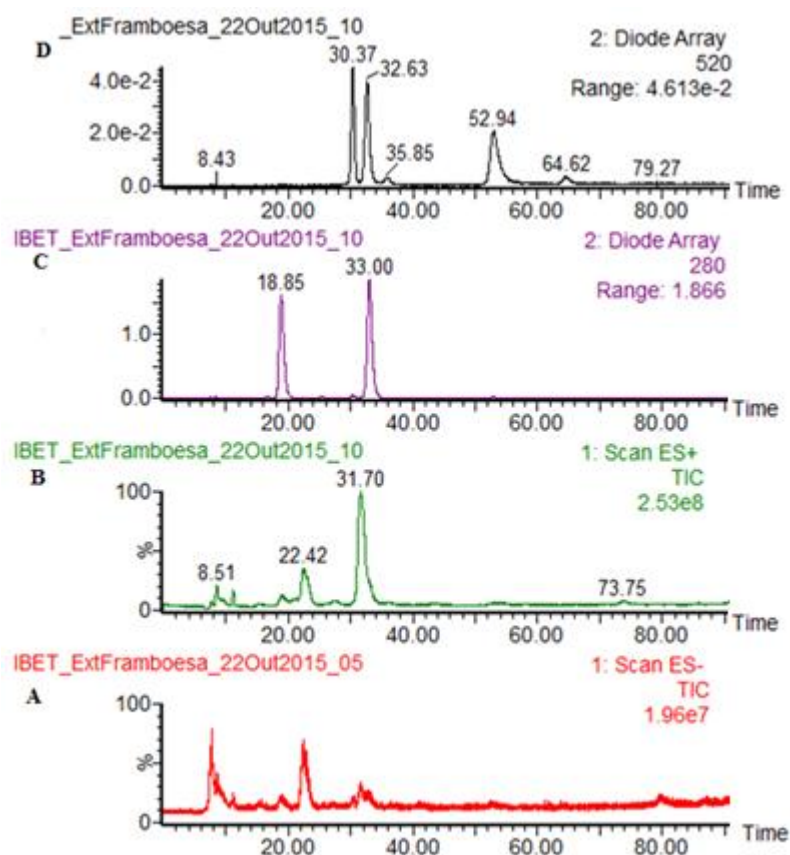


Figura I.5 - Cromatograma tipo de uma amostra de extrato de framboesa analisada por (A) MS (modo Full SCAN negativo), (B) MS (modo Full SCAN positivo), (C) DAD a 280 nm, (D) DAD a 520 nm.

Foram identificadas antocianinas a maioria derivadas da cianidina (cujos espetros de MS/MS mostravam o ião produto m/z 287, característico da cianidina) e pelargonidinas (cujos espetros de MS/MS mostravam o ião produto m/z 271, característico da pelargonidina). As cianidinas identificadas incluíram cianidina-3-soforósido¹⁰⁷ e cianidina-3-glucosilrutínósido¹⁰⁷ (pico 5), cianidina-3-xilosilrutínósido¹⁰⁷, cianidina-3-sambubiósido¹⁰⁷, cianidina-3-sambubiósido-glucósido, cianidina-3-glucósido¹⁰⁷ e cianidina-3-rutínósido¹⁰⁷ (pico 6)¹⁰⁷.

O perfil em antocianinas nas amostras analisadas diferiu. Nas Figuras I.6 e I.7 apresentam-se os cromatogramas de massa de antocianinas dos extratos metanol:água:ácido fórmico (79,9:20:0,1 v/v/v) de amostras de framboesas das cv. Himbo-top e Amira de 2013. A análise HPLC-DAD-MS/MS destes extratos foi realizada nas condições referidas para a Figura I.5. As framboesas da cv. Erika apresentam uma composição nestes flavonóides semelhante às da cv. Himbo-top, enquanto os frutos da cv. Polka tinham um perfil em antocianinas semelhante ao da cv. Amira. Nestas últimas as cianidina-3-glucosilrutínósido, cianidina-3-xilosilrutínósido e pelargonidina-3-rutínósido não foram detetadas.

Tabela I.9 – Tentativa de identificação dos principais compostos do extrato metanol: água: ác. fórmico (79,9:20;0,1 v/v/v) de frutos da cv. Himbo-top (2013) por LC-DAD-MS/MS efetuados em modo positivo (+) e negativo (-)

PICO (Nº)	FÓRMULA	T _R (MIN)	MM (g/mol)	[M-H] (m/z)	IÕES MS/MS (m/z)	λ _{MÁX.} (nm)	COMPOSTO (Identificação Provável)	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS
1	C ₄ H ₆ O ₅	8.58	134	133 ⁻	115	231	ácido málico	309
	C ₆ H ₈ O ₇	8.77	192	191 ⁻	111	230	ácido cítrico	309
2	C ₆ H ₁₂ O ₆	11.15	192	191 ⁻	111,173	227	ácido quínico	315
3	C ₇ H ₆ O ₃	16.45	138	137 ⁻	93	227	ácido hidroxibenzóico	87
4	C ₄₈ H ₂₈ O ₃₀	24.46	784	783 ⁻	222, 228	234	bis-HHDP-glucose	316
5	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₄	29.89	756	757 ⁺	611, 287	280, 524	cianidina-3-glucosilrutinosido	38,73,107,301,314
	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₆	29.94	610	611 ⁺	287	280, 524	cianidina-3-soforósido	38,73,107,301,310,314
6	C ₃₂ H ₃₉ O ₁₉	31.25	727	727 ⁺	449, 287,581	280, 517	cianidina-3-xilosilrutinosido	69,73,314
	C ₂₆ H ₂₉ O ₁₅	31.60	581	581 ⁺	287	233, 516	cianidina-3-sambubiósido	314
	C ₁₂₃ H ₈₀ O ₇₈	31.62	2822	1401 ⁻²	301	233	lambertianina C	38,73,310,314
	C ₈₂ H ₅₄ O ₅₂	31.64	1871	934 ⁻²	633, 301	233	sanguina H-6	38,73,310,314
	C ₄₁ H ₂₈ O ₂₆	31.65	936	935 ⁻	230, 278	233	casuarinina	310
	C ₃₂ H ₃₉ O ₂₀	31.77	743	743 ⁺	595, 287	278, 516	cianidina-3-sambubiósido-glucósido	314
	C ₃₃ H ₄₁ O ₁₉	31.83	741	741 ⁺	595, 271	232, 510	pelargonidina-3-glucosilrutinosido	66,73,107,314
	C ₂₇ H ₃₁ O ₁₅	31.92	595	595 ⁺	271	278, 503	pelargonidina-3-soforósido	73,107,310,314
	C ₂₁ H ₂₁ O ₁₁	32.27	449	449 ⁺	287	280, 517	cianidina-3-glucósido	38,73,107,301,314
	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₁	32.41	448	447 ⁻	285	368, 516	canferol-3- glucósido	66,80,316
	C ₂₇ H ₃₁ O ₁₅	32.43	595	595 ⁺	449, 297	279, 517	cianidina-3-rutinosido	38,73,107,310,314
	C ₂₇ H ₃₁ O ₁₄	35.34	579	579 ⁺	271, 433	244, 509	pelargonidina-3-rutinosido	107,301
	C ₂₁ H ₂₁ O ₁₀	35.35	433	433 ⁺	271	276, 505	pelargonidina-3-glucósido	66,73,107,301,314
	C ₁₉ H ₁₄ O ₁₂	38.61	434	433 ⁻	301	244, 350	ácido elágico-arabinósido	9,314
7	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₆	38.69	610	609 ⁻	301	249, 350	quercetina-3-rutinosido	9,66,314
	C ₂₁ H ₁₈ O ₁₃	40.79	478	477 ⁻	301	249, 358	quercetina-3-glucoronido	9,66,314
8	-	41.50	-	463 ⁻	301	248, 360	derivado do Ácido elágico	317
	-	49.02	-	463 ⁻	301	247, 360	derivado do Ácido elágico	317
	C ₂₀ H ₁₆ O ₁₂	49.18	448	447 ⁻	315	248, 350	pentósido do Ácido elágico	9,314

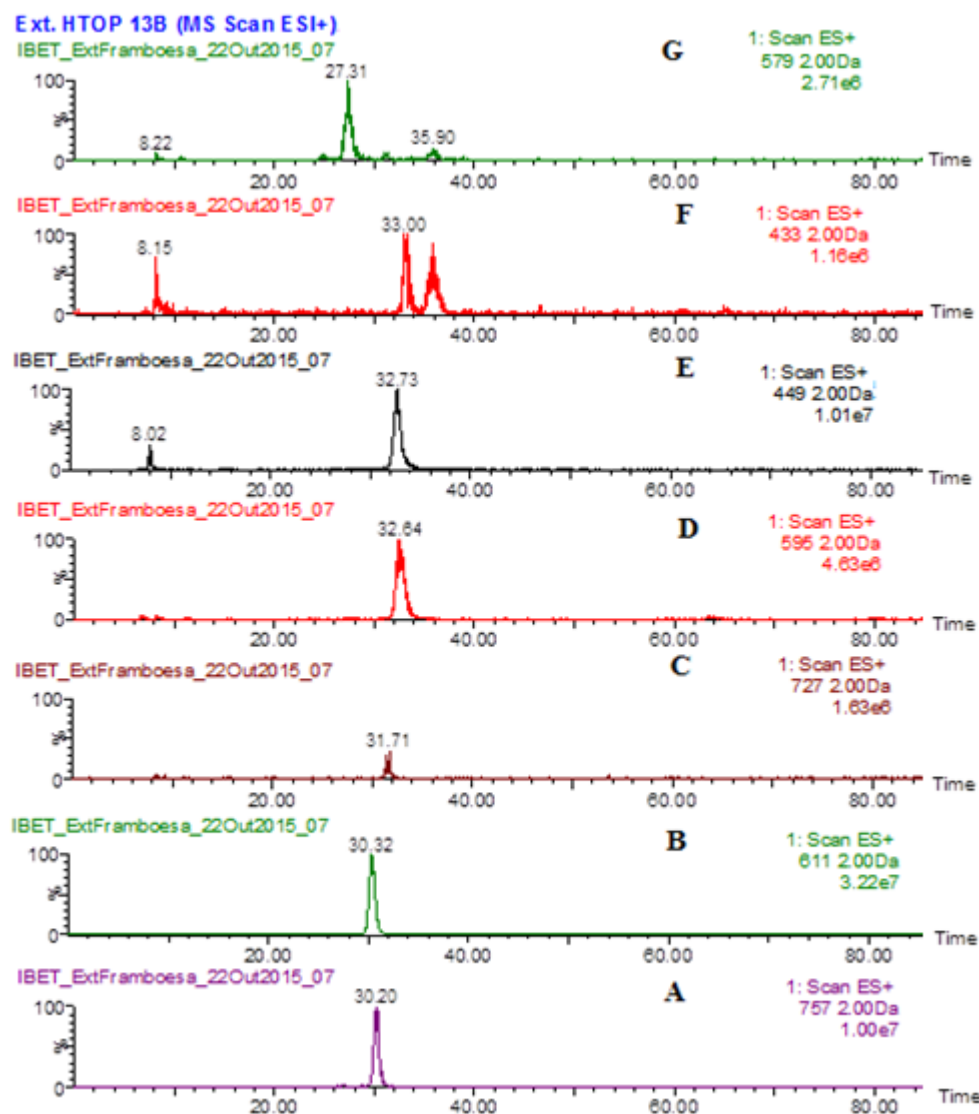


Figura I.6 – Cromatogramas de massa de antocianinas do extrato de framboesas da cv. Himbo-top 2013 (modo MS Scan ESI⁺): (A) cianidina-3-glucosilrutinosídeo t_r 30,20 min, m/z 757; (B) cianidina-3-soforósido t_r 30,32 min, m/z 611; (C) cianidina-3-xilosilrutinosídeo t_r 31,71 min, m/z 727; (D) cianidina-3-rutinosídeo t_r 32,64 min, m/z 595; (E) cianidina-3-glucósido t_r 32,73 min, m/z 449; (F) pelargonidina-3-glucósido t_r 33,00 min, m/z 433; (G) pelargonidina-3-rutinosídeo t_r 35,90 min e m/z 579.

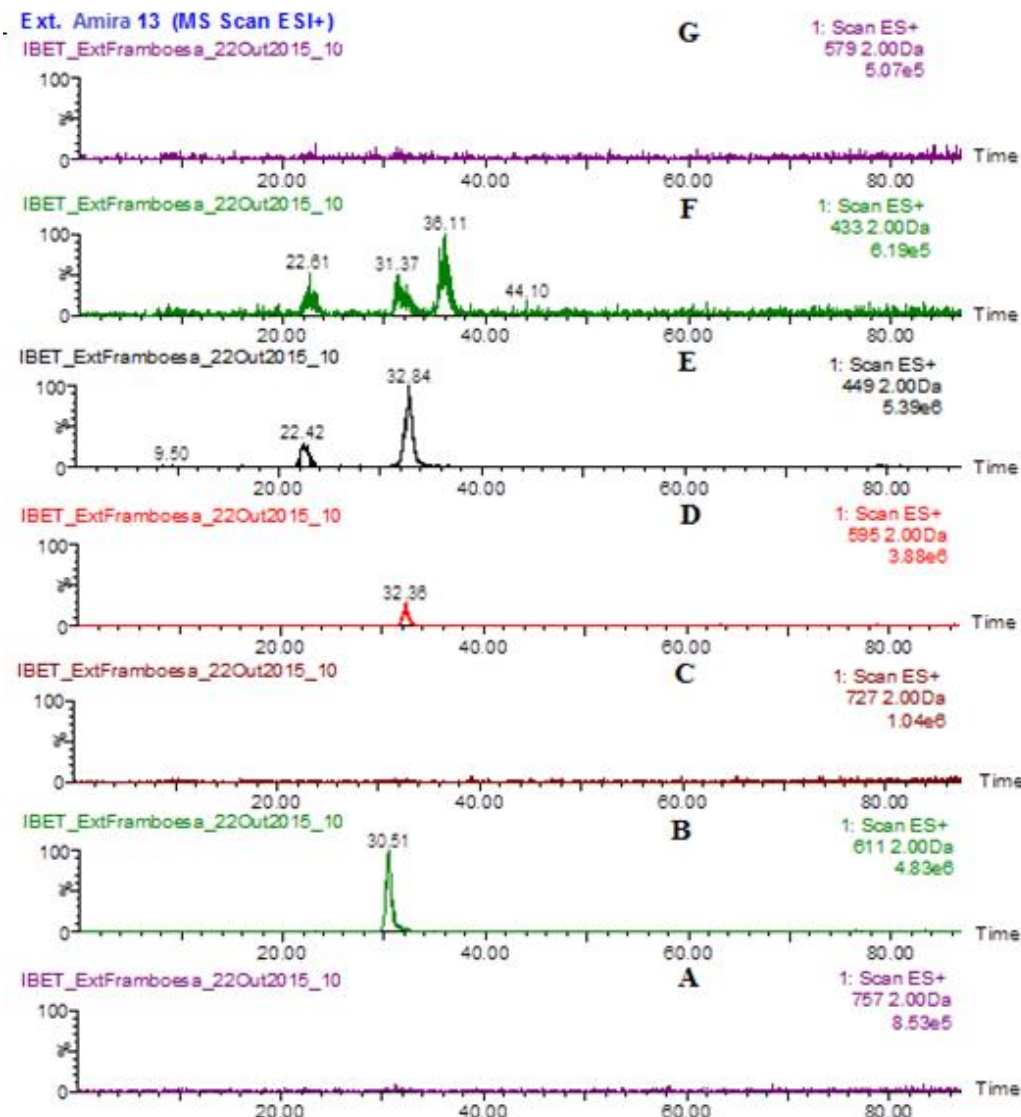
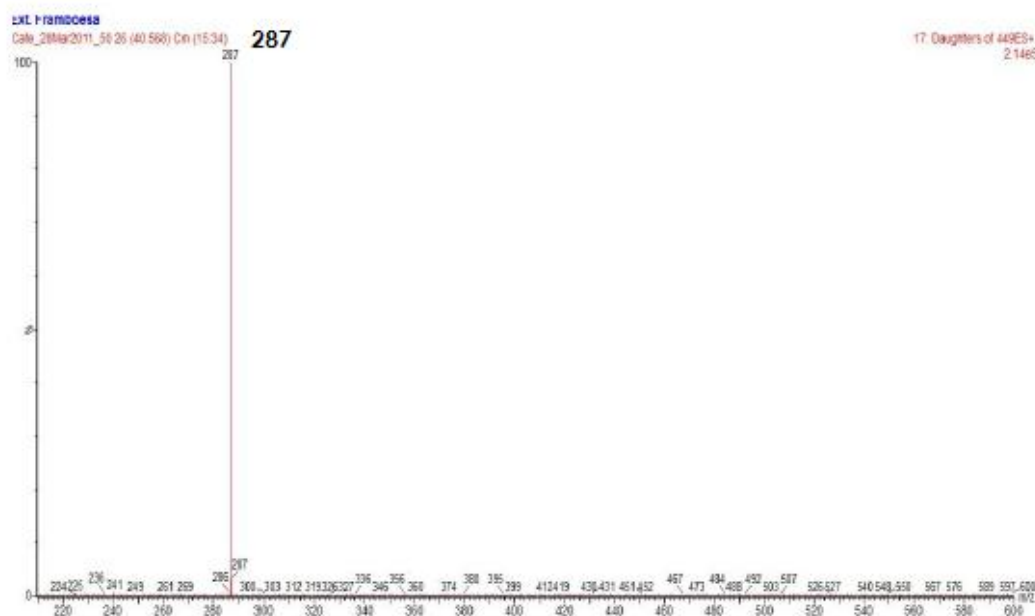
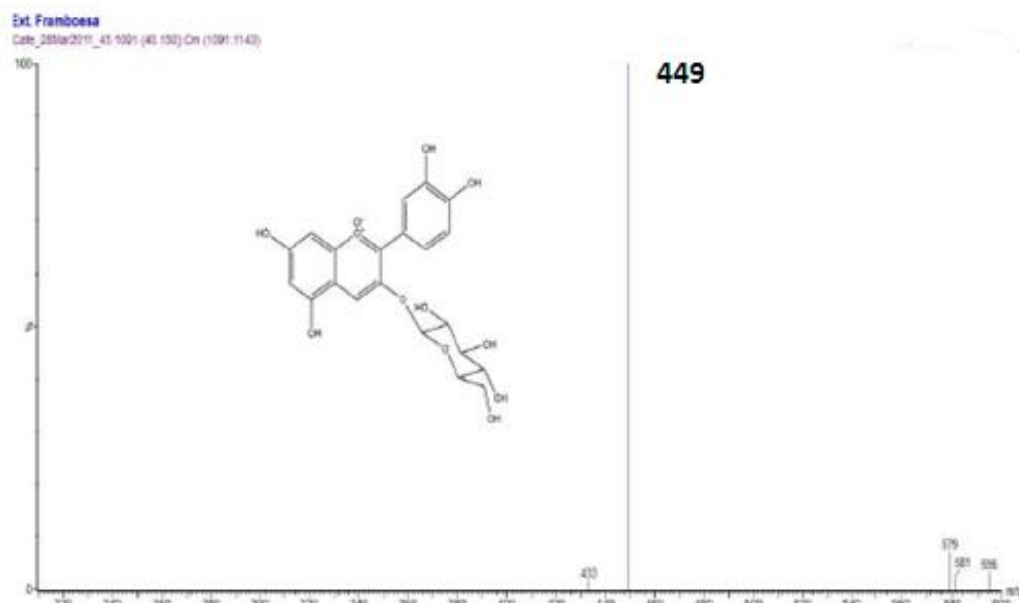


Figura I.7 – Cromatogramas de massa de antocianinas do extrato de framboesas da cv. Amira 2013 (modo MS Scan ESI⁺): (A) cianidina-3-glucosilrutinosídeo, m/z 757; (B) cianidina-3-soforósido t_r 30,32 min, m/z 611; (C) cianidina-3-xilosilrutinosídeo, m/z 727; (D) cianidina-3-rutinosídeo t_r 32,64 min, m/z 595; (E) cianidina-3-glucósido t_r 32,73 min, m/z 449; (F) pelargonidina-3-glucósido t_r 33,00 min, m/z 433 (pico); (G) pelargonidina-3-rutinosídeo, m/z 579.

A cianidina-3-glucósido é uma das antocianinas maioritárias. A título ilustrativo apresenta-se o espectro de massa desta antocianina (ião molecular a m/z 449) e o espectro MS/MS resultante da fragmentação do seu ião precursor (Figuras I.8 A e B).

A.



B.

Figura I.8 – (A) Espectro de massa identificado como cianidina-3-glucósido; (B) Espectro MS/MS do ião precursor (m/z 449).

As pelargonidinas identificadas são a pelargonidina-3-glucosilrutinosídeo e pelargonidina-3-soforósídeo (pico 6), pelargonidina-3-glucósídeo e pelargonidina-3-rutinosídeo (pico 7) (Tabela I.9).

No extrato foi ainda possível confirmar-se a possível identificação de flavonóis (quercetina-3-rutinosídeo e canferol-glucósídeo) e ácidos fenólicos nomeadamente ácidos hidroxicinâmicos ou derivados (ácido protocatechuico, cafeiol glucósídeo, ácido *p*-coumárico) e ácidos hidroxibenzóicos (gálgico, hidroxibenzóico e hexósídeos do ácido elágico).

Embora rico em taninos hidrolisáveis, nas condições ensaiadas (aquisição de valores máximos de m/z até 1500) foi possível detetar no extrato a casuarinina (ião precursor m/z 935) e (galhoil-bis-HHDP-glucose) (ião MS a m/z 935; iões MS/MS a m/z 633, 301, correspondendo às unidades glucosil, galhoil e HHDP, M-332 e M-302, respetivamente, e ao ácido elágico), um monómero de os elagitaninos vulgarmente encontrado nos frutos de *Rubus idaeus* L. lambertianina C (6 HHDP, 3 galhoil e 3 glucosil) (pico 5), sanguina H-6 (4 HHDP, 2 galhoil e 2 glucosil) e casuarinina (ião MS a m/z 481; ião MS/MS a m/z 301) (pico 6); o HHDP-glucose (ião MS a m/z 481; ião MS/MS a m/z 301) (pico 4). Este último poderá ter resultado de reações de hidrólise, possivelmente resultado da ação de tanases de origem fúngica.

As proantocianidinas são polifenóis minoritários das framboesas⁶⁷. As condições analíticas usadas nesta análise não possibilitaram a identificação destes compostos no extrato.

Foram ainda identificados usando esta metodologia ácido cítrico (m/z 191) e ácido málico (m/z 134) (pico 1) e ácido quínico (m/z 191) (pico 2). Os ácidos cítrico e málico são ácidos orgânicos predominantes na framboesa, sobretudo o cítrico⁴⁵.

A utilização de deteção eletroquímica (ED) combinada com HPLC tem suscitado muito interesse recentemente^{316,318,319}. A atividade eletroquímica dos compostos fenólicos deve-se sobretudo à presença e ao número de grupos hidroxilo (OH) ligados aos anéis aromáticos que podem participar em reações de oxidação³¹⁶. Esta propriedade está diretamente relacionada com a estrutura dos compostos e com a concentração destas

moléculas na amostra³¹⁶. Quanto mais baixo o potencial de redução dos compostos, maior será a sua capacidade antioxidante¹⁰⁰.

O cromatograma apresentado na Figura I.9 comparar os perfis cromatográficos da amostra obtidos ao c.d.o. de 280 nm e o cromatograma obtido no modo de detecção eletroquímico. Desta forma é possível concluir acerca de compostos que nas condições de ensaio do detetor eletroquímico são detetados e que podem ser responsáveis pela atividade antioxidante determinada nas amostras. É de salientar que estes cromatogramas são muito mais simples que os obtidos pela detecção com DAD. As antocianinas apesar de presentes em maior concentração na amostra exibem um sinal eletroquímico com intensidade semelhante ao dos restantes compostos. Em termos estruturais as diferentes antocianinas identificadas na amostra apresentam diferenças que podem influenciar as suas propriedades eletroquímicas. Ao contrário das pelargonidinas as cianidinas apresentam ligações o-difenil anel B pelo que podem apresentar uma capacidade antioxidante superior³²⁰. A hidroxilação no anel B (quanto maior o número de grupos hidroxilo maior a capacidade antioxidante) e/ou a metilação do anel C (metilações no C-3' diminuem a capacidade antioxidante) influencia igualmente a capacidade antioxidante das antocianinas³²⁰. Também a natureza e o número de açúcares ligados à molécula, a posição destas ligações e a natureza e o número de ácidos alifáticos e/ou aromáticos ligados a açúcares na molécula também contribui para diferenças na capacidade antioxidante das várias antocianinas³²⁰.

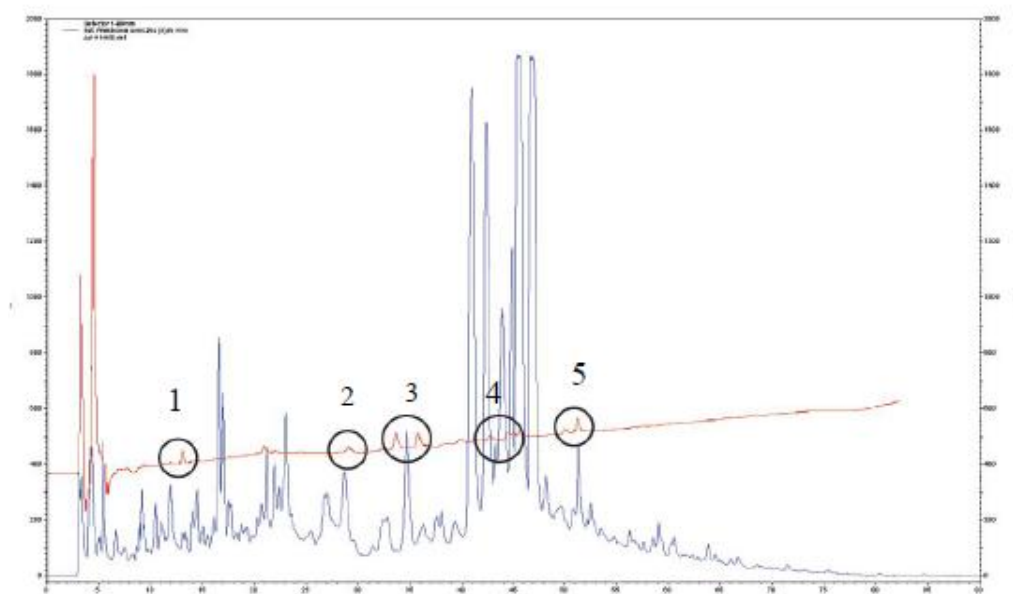


Figura I.9 - Análise HPLC-DAD-ED. Sobreposição dos cromatogramas HPLC-DAD ao c.d.o 280 nm (azul) e HPLC-ED (vermelho) do extrato de metanol:acetona (50:50 v/v) de framboesa. ^{1,5} Ácidos hidroxibenzóicos; ^{2,3} Ácidos hidroxicinâmicos; ⁴Antociannas.

Os restantes compostos presentes não foram identificados. Considerando o seu tempo de retenção, são provavelmente ácidos hidroxicinâmicos e ácidos hidroxibenzóicos.

Os compostos identificados na análise HPLC-DAD-MS/MS incluem os ácidos protocatechuico, p-coumárico, gálico e hidroxibenzóico e um derivado do ácido cafeico, o cafeiol glucose, um monómero de elagitaninos, o HHDP-glucose, e o elagitanino casuarinina (Tabela I.11). De acordo com dados da bibliografia todos estes compostos fenólicos apresentam atividade eletroquímica^{316,320}. Regra geral os flavonóis apresentam propriedades antioxidantes superiores à das antocianinas, nomeadamente a quercetina e seus derivados³²⁰. Na análise HPLC-DAD-MS/MS foram ainda identificados quercetina, canferol-glucósido e canferol-glucorónido. Embora os flavonóis sejam compostos fenólicos minoritários nas framboesas, sendo potentes antioxidantes poderão igualmente dar um contributo para a capacidade antioxidante global daqueles pequenos frutos.

2.4 Estudo da composição fenólica de amostras de framboesa no ano 2011 e evolução da composição ao longo do tempo de colheita

2.4.1 Estudo da composição fenólica de amostras de diferentes cultivares no ano 2011

Na tentativa de selecionar uma cultivar de framboesa para um estudo de intervenção nutricional em humanos, avaliou-se a composição fenólica de quatro cultivares de *Rubus idaeus* L. (Himbo-Top, Amira, Erika, Polka) com expressão nacional, produzidas nas mesmas condições culturais e edafoclimáticas no Litoral Alentejano, no Outono de 2011. A abundância em fenóis, flavonóides e taninos hidrolisáveis totais bem como o perfil fenólico foram os parâmetros avaliados e que constituíram critérios de seleção. Na Tabela I.10 apresentam-se os resultados médios obtidos.

O teor médio em fenóis totais (FT) e em flavonóides totais (FLT) das framboesas das quatro cultivares variou, respectivamente, entre 265,2 – 300,0 mg EAG/100 g FF e 29,6 – 37,2 mg EC/100 g FF (Tabela I.10). Em ambos os casos as diferenças observadas entre as cultivares não apresentaram significado estatístico ($p > 0,05$). No entanto há uma tendência para valores médios mais baixos corresponderem ao extrato da cv. Erika e os mais elevados aos da cv. Amira. Estes resultados foram obtidos utilizando um método espectrofotométrico. Como as amostras foram analisadas por HPLC, foi possível determinar

o teor de FT utilizando esta metodologia. Os valores obtidos são mais baixos o que é explicado pelo fato de ao utilizar o método cromatográfico se eliminarem algumas interferências que ocorrem no método espectrofotométrico. No entanto a maioria dos dados publicados na bibliografia reporta os valores determinados pelo método espectrofotométrico de Folin Ciocalteu.

Tabela I.10 Composição fenólica de framboesas de quatro cultivares produzidas no Outono de 2011 (média de pelo menos 3 replicados \pm DP)

PARÂMETRO	Cv. HIMBO-TOP	Cv. AMIRA	Cv. ERIKA	Cv. POLKA	DADOS DA BIBLIOGRAFIA ^(REF)
FT (mg EAG/100g FF)	291,6^a \pm 61,88	300,0^a \pm 76,76	265,2^a \pm 47,96	267,0^a \pm 106,9	183,1 – 340,0 ^{38,62,301}
FLT (mg EC/100g FF)	36,8^a \pm 3,97	36,2^a \pm 8,96	29,6^a \pm 4,48	37,2^a \pm 7,84	25,3 – 41,1 ⁷⁴
FT, HPLC-DAD, ao c.d.o. 280 nm (mg EAG/100g FF)	170,2	145,2	115,7	129,5	118 - 212 ³⁸
AT, HPLC-DAD, ao c.d.o. 520 nm (mg EC3G/100g FF)	70,4	66,4	53,8	88,6	37,5 – 113,4 ³⁸
ET, HPLC-DAD, ao c.d.o. 280 nm (mg EAG/100g FF)	42,8	42,2	38,7	34,9	57,6 – 154,5 ³⁸
THT (mg EAT/100g FF)	412,8 \pm 7,37	439,3 \pm 10,56	365,1 \pm 4,47	411,2 \pm 9,54	-

Os valores da mesma linha com letras distintas indicam uma diferença significativa, pelo teste de Bonferroni ($p < 0,05$) entre os parâmetros considerados; **A** – Resultados médios das 5 amostras; **B** – Resultados da mistura das 5 amostras; AT – antocianinas totais; DP – desvio-padrão; EAG – equivalentes de ácido gálico; EC – equivalentes de (+) – catequina; EAT – equivalentes de ácido tânico; EC3G – equivalentes de cianidina-3-glucósido; ET – elagitaninos totais; FT – fenóis totais, método Folin; FLT – flavonóides totais; n – n° de observações; THT – taninos hidrolisáveis totais.

O teor em antocianinas totais (AT) era mais elevado na cultivar Polka (88,6 mg EC3G/100g de FF) contrariamente à cv. Erika que apresentava o teor mais baixo (53,8 mg EC3G/100g de FF). Os valores obtidos encontram-se dentro dos valores reportados na literatura.

Os teores em elagitaninos totais (ET) eram mais baixos na cultivar Polka e mais elevados para as cv. Himbo e Amira.

O teor em taninos hidrolisáveis totais (THT) dos extratos mistura das 4 cultivares variou entre 365,1 – 439,3 mg EAT/100 g FF (Tabela I.10). O valor mais baixo foi, à

semelhança dos ensaios anteriores, o da cv. Erika; a cv. Amira apresentou o teor mais elevado.

Dos resultados obtidos pode concluir-se que os teores relativos à composição fenólica das framboesas em estudo estão dentro dos valores reportados na bibliografia³⁸ para frutos de *Rubus idaeus* L. (Tabela I.10). Mazur *et al.*³⁸ analisaram a composição fenólica de framboesas de 10 genótipos, entre 2009 e 2011 tendo o teor em fenóis totais, determinados pelo método de Folin-Ciocalteu, variado entre 186 e 315 mg EAG/100 g FF³⁸. Os teores em flavonóides totais obtidos por Sariburun *et al.*⁷⁴ em extratos metanólicos de frutos (Tabela 1.10) apresentavam valores semelhantes aos apresentados neste trabalho. Ao contrário do constatado neste estudo, estes investigadores turcos encontraram diferenças estatisticamente significativas para as diferentes cultivares. Pelo contrário, Chen *et al.*³⁰¹ reportaram teores em flavonóides totais respeitantes a framboesas vermelhas de 9 genótipos muito superiores aos obtidos neste estudo: 139,04 e 279,26 mg EC/ 100 g FF. O impacto do genótipo nos teores em fenóis totais e flavonóides destas framboesas foi considerado estatisticamente significativo ($p < 0,05$).

A análise por HPLC-DAD das amostras em estudo compreendeu uma comparação dos perfis cromatográficos a diferentes c.d.o., seguida da quantificação de alguns compostos identificados (HPLC-MS/MS) com base em retas de calibração com padrões.

A sobreposição dos cromatogramas dos quatro extratos de framboesas obtidos com o detetor DAD aos c.d.o. 280, 360 e 520 nm mostrou que os perfis cromatográficos destas amostras eram muito semelhantes do ponto de vista qualitativo, no entanto ocorria alguma variabilidade no que se refere aos teores dos diferentes componentes. Esta variabilidade é ilustrada na Figura I.10, que corresponde à comparação dos perfis de antocianinas detetadas a 520 nm. Os cromatogramas mostram que a cv. Himbo-top (A) e Erika (C) são mais parecidas em termos de composição em antocianinas, formando a cv. Amira (B) e Polka (D) outro grupo. O resultado da quantificação dos compostos detetados a este c.d.o. nos cromatogramas das diferentes cultivares é apresentado na Figura I.11. Apresenta-se também o valor correspondente à determinação das antocianinas totais.

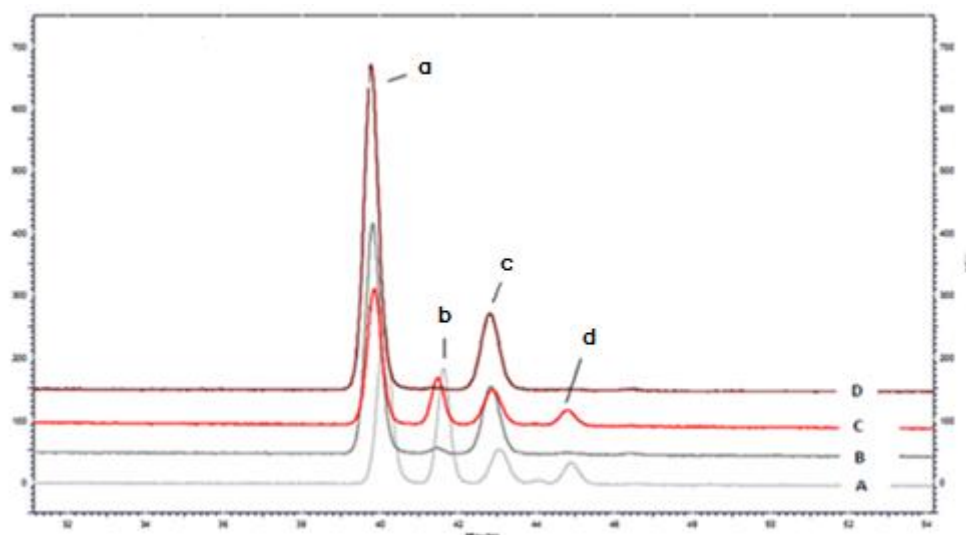


Figura 1.10 - Comparação dos perfis cromatográficos dos extratos metanol: água: ácido fórmico (79,9:20:0,1 v/v/v) de framboesas das cultivares Himbo-top (A), Amira (B), Erika (C) e Polka (D), diluídos (1:2,5), ao c.d.o. 520 nm.
a - cianidina-3-soforósido; **b** - cianidina-3glucosilrutínósido; **c** - cianidina-3-glucósido; **d** - cianidina-3- rutínósido.

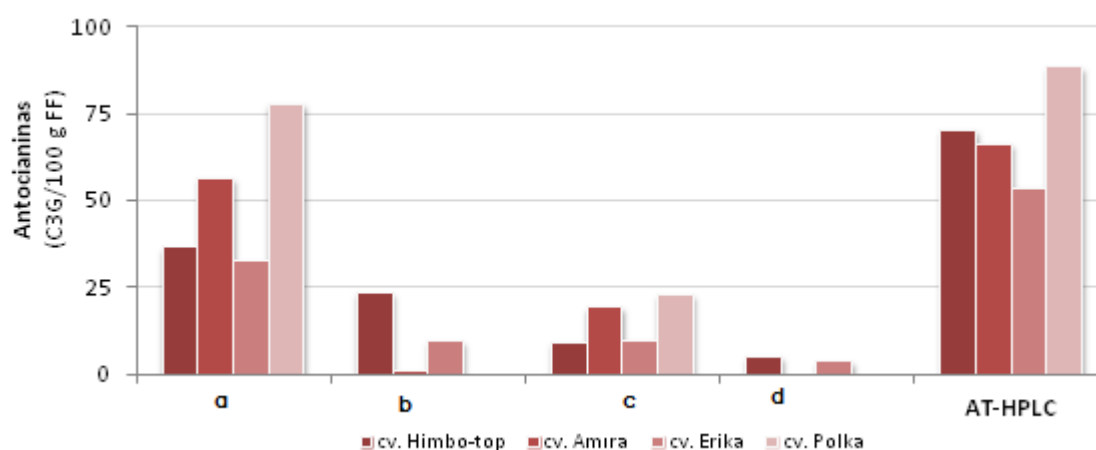


Figura 1.11 - Composição e conteúdo em antocianinas totais (AT) dos extratos metanol:água:ácido fórmico (79,9:20:0,1 v/v/v) de framboesas de quatro cultivares, produzidas no Outono de 2011, separadas por HPLC-DAD ao c.d.o. 520 nm.
a – cianidina-3-soforósido; **b** - cianidina-3glucosilrutínósido; **c** - cianidina-3-glucósido; **d** - cianidina-3- rutínósido.

As antocianinas descritas como dominantes nos frutos de *Rubus idaeus* L. incluem a cianidina-3-soforósido, a cianidina-3-glucósido, a cianidina-3-glucosilrutínósido e a cianidina-3-rutínósido^{38,44,69}. As antocianinas presentes nos extratos foram quantificadas a partir de padrões de cianidina-3-glucósido e os seus teores foram expressos em mg de equivalentes de cianidina-3-glucósido/100 g de FF. Nas amostras estudadas, o teor em: (i) cianidina-3-soforósido (pico 4) variou entre 32,6 (cv. Erika) e 78,0 mg EC3G/100 g FF (cv. Polka); (ii) cianidina-3-glucosilrutínósido (pico 5) oscilou entre não detetado (ND) (cv. Polka) e 23,6 mg EC3G/100 g FF (cv. Himbo-top); (iii) cianidina-3-glucósido (pico 6) assumiu valores entre 9,1 e 22,7 mg EC3G/100 g FF (cv. Polka); (iv) cianidina-3-rutínósido (pico 7) não foi detetada nas cv. Amira e Polka e nas restantes variedades o seu conteúdo assumiu valores entre 3,7 (cv. Erika) e 5,1 mg EC3G/100 g FF (cv. Himbo-top).

A variabilidade na composição fenólica das framboesas pode ser condicionada pelo estado de maturação, a cultivar, local e época de produção, técnicas culturais, tempo, tecnologia e condições de armazenagem, bem como metodologias de preparação das amostras. Diversos estudos sugerem que o genótipo é o fator que mais influencia a composição fenólica de pequenos frutos^{42,43,62,73} mas a partir dos ensaios efetuados neste estudo não foi possível chegar a essa conclusão, o que poderá ser também devido a um número relativamente pequeno de amostras utilizado.

Considerados os resultados da composição fenólica das quatro cultivares analisadas seleccionámos a cv. Amira para o estudo nutricional de intervenção em humanos. Esta cultivar foi a que apresentou teores mais elevados em fenóis totais e taninos hidrolisáveis totais. De acordo com dados preliminares associados com a produção de framboesas na HEF, neste período, a cv. Amira foi a mais produtiva².

² Oliveira, P. – comunicação pessoal, Junho de 2012.

2.4.2 Estudo da evolução da composição fenólica de amostras de diferentes cultivares ao longo do tempo de colheita

Foram colhidas amostras em 5 tempos diferentes, no Outono de 2011. Os resultados obtidos para os teores totais em fenóis e flavonóides e o teor médio destes parâmetros para cada cultivar ensaiada encontram-se na Figura I.12.

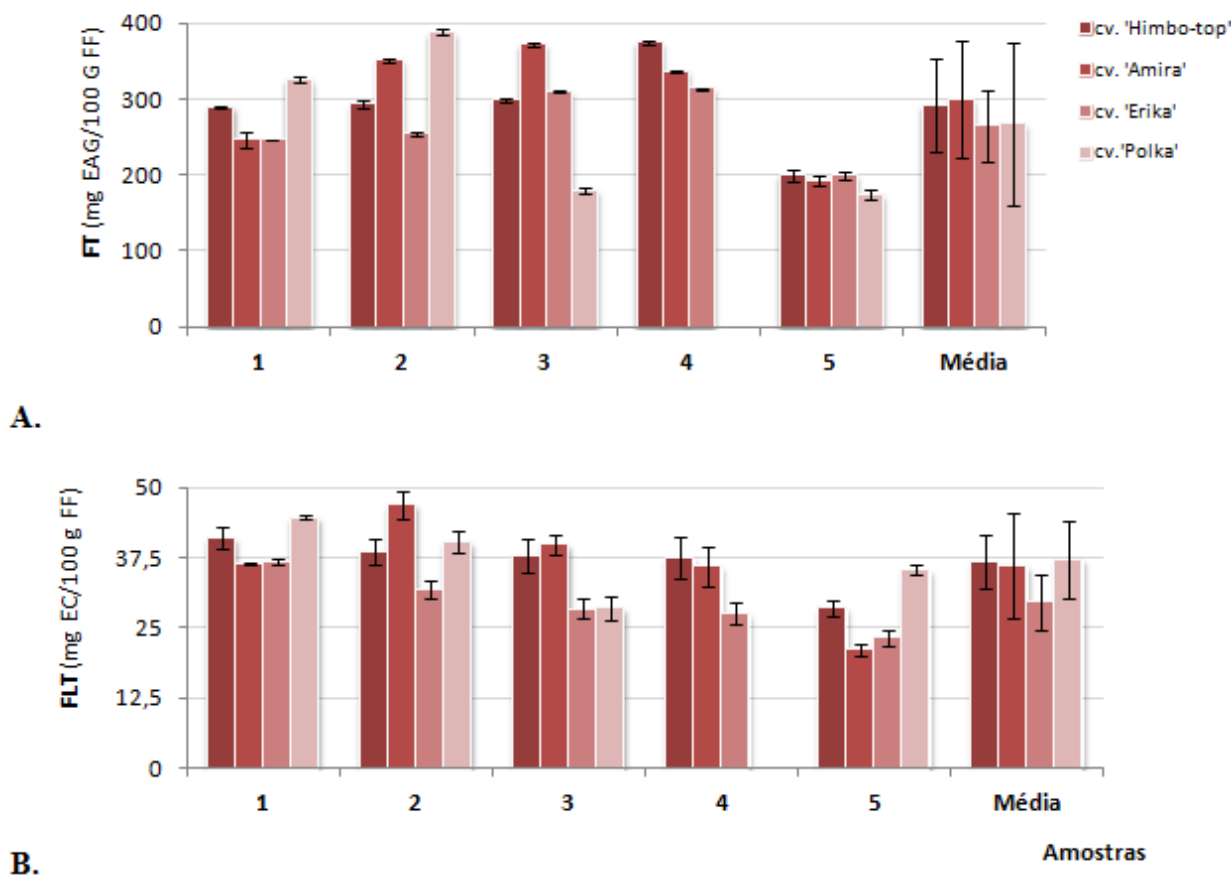


Figura I.12 – Evolução do conteúdo em fenóis totais (A) e flavonóides totais (B) de frutos das 4 cultivares de *Rubus idaeus* L. em 2011.

Tempos de colheita das amostras: 1) 11 de Outubro; 2) 25 de Outubro; 3) 7 de Novembro; 4) 14 de Novembro; 5) 2 de Dezembro.

Relativamente aos teores em fenóis totais, observou-se que, parece haver uma tendência para o aumento da concentração durante os 2-3 pontos iniciais de amostragem, ocorrendo posteriormente uma diminuição dessa concentração. Esta tendência é comum a todas as cultivares mas o período em que foi observado o teor máximo variou com a cultivar. Assim para as cultivares Himbo-Top e Erika o máximo é atingido na 4ª data de

colheita, enquanto para a cv. Polka é atingido na 2^a e na cv. Amira na 3^a. Em Dezembro, na 5^a data de colheita, observou-se um decréscimo do teor em fenóis totais em todas as cultivares, à exceção da cv. Polka. O teor em fenóis totais nas 5 amostras analisadas não apresentou diferenças estatisticamente significativas.

No que se refere aos teores em flavonóides totais, salvo algumas exceções, parece haver uma tendência para a diminuição dos teores ao longo do período de colheita. Mais uma vez os valores médios obtidos mostram que não há diferenças estatisticamente significativas ($p>0,05$) entre as diferentes cultivares. As diferenças eram estatisticamente significativas ($p<0,05$) para as amostras aos diferentes tempos, com exceção para a cv. Polka.

Os Cv inter-genótipos dos teores em fenóis e flavonóides totais (Tabela I.11) eram mais baixos do que os reportados na bibliografia. A variação observada parece dever-se sobretudo a um decréscimo acentuado na concentração daqueles parâmetros fenólicos no final do ciclo produtivo (Figura I.12).

Tabela I.11 – Coeficientes de variação (%) de teores em compostos fenólicos e flavonóides de frutos de *Rubus idaeus* L. produzidos no Outono de 2011

	FT	FLT
cv. Himbo-top	21	11
cv. Amira	26	25
cv. Erika	18	15
cv. Polka	40	21
Entre Genótipos (dados da bibliografia ^{ref.})	6 (14 ⁶⁸)	10 (19 ^{74,68})
No Outono de 2011	27	10

A – amostra; M – massa; DT – diâmetro transversal; DL – diâmetro longitudinal; FT – fenóis totais; FLT – flavonóides totais.

Este tipo de estudo terá interesse para avaliar o período ótimo de colheita que poderá não ser exatamente o mesmo para cada cultivar. No entanto os resultados obtidos não serão suficientes para tirar conclusões sobre estas variações, podendo no entanto concluir-se sobre tendências relativamente às diferentes cultivares.

2.5 Estudo da evolução da composição fenólica de amostras de cultivares de framboesa de 2011-2013

Procedeu-se ao estudo comparativo das diferentes cultivares (Himbo-top, Amira, Erika e Polka) em 3 Outonos consecutivos (2011 a 2013). O que permitiu avaliar a variabilidade da composição decorrente dos diferentes anos de cultivo. Na Tabela I.12 apresentam-se os dados médios dos teores em fenóis, flavonóides, antocianinas, taninos hidrolisáveis e taninos condensados totais. Os dados individuais encontram-se na Tabela 1 do Apêndice B.

Os valores obtidos para estes parâmetros estão dentro da gama de valores reportados na bibliografia (Tabela I.13). Os resultados mostram que não há diferenças estatisticamente significativas entre génotipos ($p > 0,05$). Pelo contrário, as diferenças entre os diferentes parâmetros para os frutos de *Rubus idaeus* L. produzidos nos vários anos, à exceção do teor em taninos condensados totais, são estatisticamente significativas ($p < 0,05$) (Tabela I.14). Os Cv inter-génotipos respeitantes às antocianinas totais (17%), taninos hidrolisáveis totais (4%) e taninos condensados totais (1%) são relativamente baixos (Tabela I.12). O Cv entre-anos para taninos condensados totais manteve o valor do Cv inter-génotipos. Pelo contrário, os Cv entre-anos para as antocianinas totais e taninos hidrolisáveis totais são cerca de 5 e 15 vezes, respetivamente, mais elevados que os anteriores (Tabela I.14).

A caracterização do perfil fenólico dos 36 extratos de framboesas respeitantes às 12 amostras das 4 cultivares nos 3 anos de cultivo, foi realizada por HPLC-DAD-ED e HPLC-DAD-MS/MS seguindo a abordagem realizada nos estudos anteriores. A título ilustrativo comparam-se na Figura I.13 os cromatogramas obtidos relativamente a amostras da cv. Amira nos 3 anos de produção.

Na Tabela I.15 A e C apresentam-se os teores médios em antocianinas individuais e totais, sanguina H-6 e elagitaninos totais, ácido elágico total e fenóis totais. Os dados individuais encontram-se na Tabela 2 do Apêndice B. Na Tabela I.15 B estão reunidos dados bibliográficos dos teores dos principais compostos fenólicos presentes em frutos de *Rubus idaeus* L. presentes noutras cultivares.

Tabela I.12 – Composição fenólica média de frutos de quatro genótipos de *Rubus idaeus* L. nos anos 2011 a 2013¹

Parâmetro	FT, Folin (mg EAG/ 100 g FF)	FLT (mg EC/ 100 g FF)	AT (mg EC3G/ 100 g FF)	THT (mg EAT/ 100 g FF)	TCT (mg EC/ 100 g FF)
Anos/Genótipo					
2011/2013					
Himbo-top	284,3 ± 58,79 ^a	58,3 ± 6,48 ^a	44,7 ± 29,79 [*]	359,2 ± 203,97 [*]	20,7 ± 0,15 [*]
Amira	262,9 ± 50,69 ^a	53,5 ± 6,95 ^a	58,3 ± 52,37 [*]	374,2 ± 216,93 [*]	20,8 ± 0,29 [*]
Erika	235,2 ± 62,05 ^a	49,7 ± 13,6 ^a	44,1 ± 42,99 [*]	347,0 ± 254,92 [*]	20,8 ± 0,21 [*]
Polka	247,8 ± 39,76 ^a	54,4 ± 4,48 ^a	60,3 ± 40,50 [*]	377,3 ± 179,30 [*]	20,9 ± 0,25 [*]
CV (%)	8	7	17	4	1

¹ - n=9 /genótipo; FT – fenóis totais; FLT – flavonóides totais; AT – antocianinas totais; THT – taninos hidrolisáveis totais; TCT – taninos condensados totais. Valores em colunas com letras diferentes são estatisticamente distintos ($p < 0,05$) pelo teste de comparação múltipla de Bonferroni; Valores em colunas com * indicam que as diferenças entre os valores indicados não são significativas em termos estatísticas ($p < 0,05$) pelo teste de comparação múltipla de Kruskal-Wallis.

Tabela I.13 – Dados bibliográficos da composição fenólica de genótipos de *Rubus idaeus* L.

Parâmetro	FT, Folin (mg EAG/ 100 g FF)	FLT (mg EC/ 100 g FF)	AT (mg EC3G/ 100 g FF)	THT (mg EAT/ 100 g FF)	TCT (mg EC/ 100 g FF)
Genótipo					
Himbo-top	-	-	-	-	-
Amira	124,0 – 134,0 ²⁸⁴	-	-	-	-
Erika	-	-	-	-	-
Polka	-	-	-	-	-
Outros Genótipos	239,1 ³⁸ ; 282,0 ⁶²	63,5 ⁶⁸ ; 41,1 ⁷⁴	44,7 ³⁸ ; 60,3 ³⁸	166,1 ¹⁵	17,7 ¹⁵
CV entre	16 ⁽ⁿ⁼⁹⁾³⁰¹	25 ⁽ⁿ⁼⁹⁾³⁰¹	25 ⁽ⁿ⁼⁹⁾³⁰¹	-	-
Genótipos (%) (bib. ref.)	16 ⁽ⁿ⁼¹⁰⁾³⁸ 20 ⁽ⁿ⁼⁴⁾⁴¹	19 ⁽ⁿ⁼⁵⁾⁶²	19 ⁽ⁿ⁼⁵⁾⁶² ; 34 ⁽ⁿ⁼¹⁰⁾³⁸	-	-

FT – fenóis totais; FLT – flavonóides totais; AT – antocianinas totais; THT – taninos hidrolisáveis totais; TCT – taninos condensados totais.

Tabela I.14 – Composição fenólica média de frutos de *Rubus idaeus* L. nos anos 2011- 2013¹

Parâmetro	FT, Folin (mg EAG/ 100 g FF)	FLT (mg EC/ 100 g FF)	AT (mg EC3G/ 100 g FF)	THT (mg EAT/ 100 g FF)	TCT (mg EC/ 100 g FF)
Ano					
2011	218,8 ± 27,95 ^a	49,9 ± 7,24 ^a	26,8 ± 11,24 ^a	207,0 ± 33,32 ^a	20,7 ± 0,15 ^a
2012	237,0 ± 18,68 ^{bd}	49,3 ± 3,86 ^{bd}	29,3 ± 3,18 ^b	278,6 ± 31,43 ^b	20,7 ± 0,05 ^a
2013	316,4 ± 25,92 ^{cd}	62,9 ± 3,10 ^{cd}	99,5 ± 17,17 ^c	607,6 ± 26,08 ^c	21,0 ± 0,31 ^a
2011/2013	257,6 ± 21,12	54,5 ± 3,58	51,9 ± 8,64	364,4 ± 14,05	20,8 ± 0,08
Dados da Bib. ref.	233,5 ^{(2009/11),38}	-	31,5 ^{(2009/11),38}	-	-
CV (%) (bib. ref.)	20(16 ³⁸)	14(19 ⁷⁴)	80 (34 ³⁸)	59	1

¹ - n=9 /genótipo; CV. – Coeficiente de variação; FT – fenóis totais; FLT – flavonóides totais; AT – antocianinas totais; THT – taninos hidrolisáveis totais; TCT – taninos condensados totais. Valores em colunas com letras diferentes são estatisticamente distintos ($p < 0,05$) pelo teste de comparação múltipla de Bonferroni.

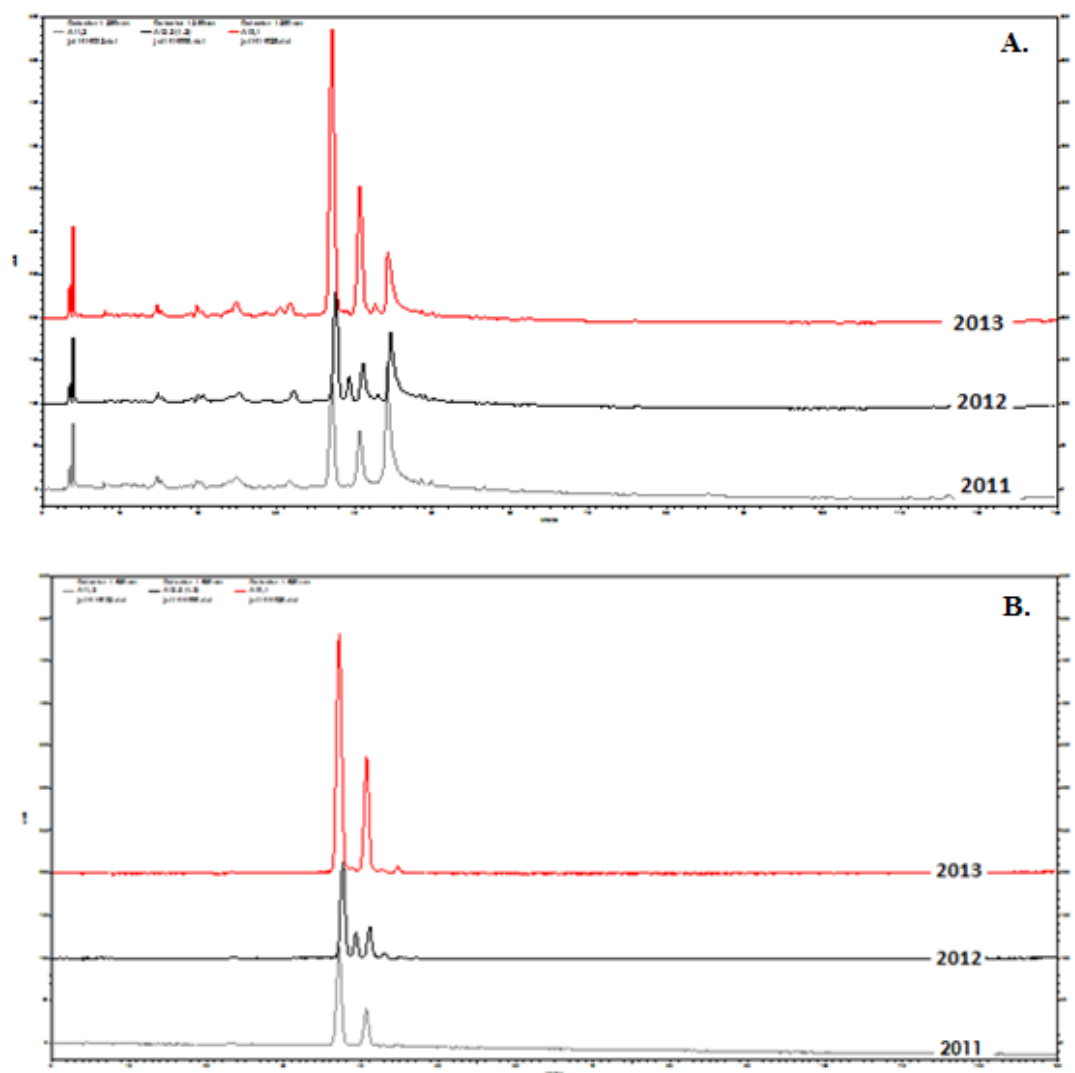


Figura I.13 - Comparação dos perfis cromatográficos de amostras da cv. Amira nos anos 2011, 2012 e 2013, a 280 nm (A) e 520 nm (B).

Tabela I.15 – Teor médio dos principais compostos fenólicos presentes em framboesas nacionais de quatro genótipos dos Outonos 2011/2013 (A), noutros genótipos (B) e em framboesas nacionais produzidas nos Outono de 2011, 2012 e 2012 (C) (n= 36); (todos os dados foram expressos por 100 g FF)²

Compostos	C3S (mg EC3G)	C3GR (mg EC3G)	C3G (mg EC3G)	C3R (mg EC3G)	AT (mg EC3G)	SH-6 (mg EAG)	ET (mg EAG)	AET (mg EAE)	FT (mg EAG)
A) Genótipo									
Himbo-top	40,1 ± 17,52 ^a	16,5 ± 2,85	11,4 ± 9,73 ^a	<0,4 ^(LD) ; 6,8*	73,4 ± 32,95*	35,6 ± 14,97 ^a	47,3 ± 31,44*	1,6 ± 0,45 ^a	126,5 ± 30,92 ^a
Amira	55,2 ± 35,05 ^a	4,7; <1,5 ^{(LQ)*}	21,9 ± 18,13 ^a	<0,4 ^(LD)	83,9 ± 55,42*	31,0 ± 8,41 ^a	49,7 ± 24,60*	1,7 ± 0,79 ^a	125,7 ± 29,6 ^a
Erika	38,6 ± 30,18 ^a	11,3 ± 6,66	14,9 ± 15,00 ^a	<1,5 ^(LQ) ; 11,6*	74,8 ± 56,05*	32,2 ± 9,78 ^a	46,5 ± 30,31*	2,6 ± 1,78 ^a	142,7 ± 35,37 ^a
Polka	67,7 ± 22,89 ^a	<1,5 ^(LQ)	24,6 ± 20,81 ^a	<0,4 ^(LD)	89,4 ± 51,13*	31,4 ± 4,0 ^a	41,9 ± 16,88	2,1 ± 0,10 ^a	127,3 ± 39,38 ^a
CV (%) (bib. ^{ref})*	27(28 ³⁹)	-	34	(22 ³⁹)	9(35 ³⁸)	6(36 ³⁸)	7(28 ³⁸)	23(32 ³⁸ ;29 ⁴³)	8(23 ³⁸)
B) Outros Genótipos									
	21 - 64 ³⁹ ;	0,6 - 19 ³⁹	4 - 25 ³⁹	0,7 - 10 ³⁹ ;	37,5 - 113,4 ³⁸	34,8-100,9 ³⁸	59,8 - 146,5 ³⁸ ;	2,0 - 5,5 ⁴³ ;	183,1 - 297,7 ³⁸
	12,8 -112,0 ³⁰¹ ;	0,5 -10,1 ³⁰¹	5,1 -72,0 ³⁰¹	0,7 - 12,4 ³⁰¹	7,6 ³¹⁰	20,3 ³¹⁰ ;	41,3 ³¹⁰ ;	0,7 - 1,4 ³⁸ ;	
						12,1 - 18,4 ³⁸	15,3 - 28,6 ³⁹	0,6 - 2,0 ³⁹	
C) Ano									
2011	32,0 ± 16,45 ^a	9,5 ± 6,01; <1,5 ^{(LQ)*}	7,9 ± 3,60 ^a	1,8 - <0,4 ^{(LQ)*}	48,2 ± 12,76**	32,5 ± 8,37 ^a	39,7 ± 16,78**	1,7 ± 0,74 ^a	116,6 ± 7,92 ^a
2012	38,8 ± 11,76 ^b	10,5 ± 4,03; <1,5 ^{(LQ)*}	10,2 ± 3,95 ^b	<0,4 ^(LD) ; <1,5 ^{(LQ)*}	56,6 ± 2,54**	26,4 ± 4,45 ^{ab}	26,8 ± 4,42**	2,6 ± 1,36 ^a	105,7 ± 10,83 ^a
2013	80,4 ± 17,66 ^c	18,9 ± 0,71; <1,5 ^{(LQ)*}	34,0 ± 15,77 ^c	<0,4 ^(LD) ; 11,6*	136,4 ± 17,5**	38,7 ± 11,58 ^{ac}	72,4 ± 23,30**	1,7 ± 0,60 ^a	168,3 ± 12,29 ^b
2011/2013	50,4 ± 26,18	-	18,5 ± 4,72	-	80,4 ± 7,61	32,5 ± 6,15	49,8 ± 19,98	2,0 ± 0,54	130,6 ± 8,13
CV (%) (bib. ^{ref})*	52(10 ³⁸)	-	67	(80 ³⁰¹)	61(10 ³⁸)	19(14 ³⁸)	51(8 ³⁸)	27(22 ³⁸)	26(9 ³⁸)

² Método de HPLC; AT – antocianinas totais; AET – ácido elágico total; CV – Coeficiente de variação; C3S – cianidina-3-soforósido; C3GR- cianidina-3-glucosilrutinosido; C3G- cianidina-3-glucósido; C3R- cianidina-3-rutinosido; SH-6 – sanguina H-6; ET – elagitaninos totais; FT- fenóis totais; LD – limite detecção; LQ – limite de quantificação. Valores em colunas com letras diferentes são estatisticamente distintos ($p < 0,05$) pelo teste de comparação múltipla de Bonferroni; Valores em colunas com * não existem diferenças significativas entre os valores indicados ($p < 0,05$) pelo teste de comparação múltipla de Kruskal-Wallis. Valores em colunas com ** existem diferenças significativas, não identificadas, entre os valores indicados ($p < 0,05$) pelo teste de comparação múltipla de Kruskal-Wallis. *Não sendo possível determinar-se a média apresentam-se os valores mínimo e máximo; **Dados relativos a outros genótipos.

2.6 Estudo da composição fenólica e da atividade antioxidante *in vitro* da amostra de framboesa usada em testes *in vitro* e em modelos animais

A caracterização química do extrato metanol:acetona (50:50 v/v), compreendeu a determinação do teor em ácido ascórbico, compostos fenólicos totais, flavonóides totais, antocianinas totais, taninos hidrolisáveis totais e taninos condensados totais. Os resultados médios (\pm desvio-padrão) destes ensaios, expressos por 100g de fruto fresco e por mL de extrato, apresentam-se na Tabela I.16.

Regra geral os teores em fenóis totais, flavonóides totais e antocianinas totais estão dentro do intervalo de valores referidos na bibliografia (Tabela I.16). Relativamente aos teores em taninos condensados e hidrolisáveis não foram encontrados dados disponíveis na bibliografia consultada. As diferenças observadas podem ter resultado da ação de diversos fatores, nomeadamente fatores ligados à produção dos frutos, como o genótipo, e fatores relacionados com a obtenção do extrato de framboesa e com a sua análise, como tratamentos aplicados à amostra. Relativamente à vitamina C considerou-se importante determinar este parâmetro no fruto e no extrato por ser por ser um antioxidante presente neste fruto que pode contribuir para os efeitos em estudo.

Neste estudo avaliou-se ainda a atividade antioxidante *in vitro* do extrato em estudo pelos métodos ORAC e HORAC. Os teores médios ORAC e HORAC, \pm desvios-padrões, obtidos para este extrato apresentam-se na Tabela I.17.

Os valores ORAC do extrato são inferiores à gama de valores referidos na bibliografia para este pequeno fruto: 1849 – 5292 μmol de ET/100g de framboesa^{80,159}. Os valores de HORAC são muito inferiores aos dados apresentados por Wu *et al.*¹²⁰. Estes resultados podem dever-se aos baixos teores obtidos para algumas antocianinas individuais e para o ácido gálico (Tabela I.17) e à redução do teor em ácido ascórbico existente nos frutos frescos resultado do processo de obtenção deste extrato, sobretudo da operação de concentração. Ainda assim, os valores obtidos permitem afirmar que o extrato de frutos de *Rubus idaeus* L. analisado apresentava capacidade antioxidante potencial elevada.

Tabela I.16 Teores em ácido ascórbico e composição fenólica de frutos de *Rubus idaeus* L. e do extrato metanol:acetona (50:50 v/v). (n=3, média ± DP).

PARÂMETRO	/100 G DE FRAMBOESA FRESCA	DADOS DA BIBLIOGRAFIA ^(REF) /100 G DE FRAMBOESA FRESCA	/ mL DE EXTRATO CONCENTRADO DE FRAMBOESA
Ácido Ascórbico (mg) ¹	16,8 ± 1,60	12,5 ²⁹⁹ ; 17,4 ³⁸ ; 20,3 ³⁸ ; 22,3 ⁵²	0,43 ± 0,052
FT (mg EAG) ¹	171,0 ± 4,17	162,0 ³⁷ ; 183,1 ³⁸ ; 189,6 ³⁸ <i>192⁶²; 177,6⁴¹; 155,7⁴¹</i>	8,57 ± 0,50
FLT (mg EC) ¹	24,5 ± 1,44	25,3 ⁷⁴ ; 63,5 ⁶⁸	1,22 ± 0,07
AT (mg EC3G) ¹	20,0 ± 2,76	22,2 ⁶⁹ ; 19,4 ³⁸	1,00 ± 0,14
THT (mg EAT) ¹	166,1 ± 0,19	-	8,31 ± 0,01
TCT (mg EC) ¹	17,7 ± 0,25	-	0,89 ± 0,10
Ácido gálico (mg) ²	2,40 ± 0,10	21,5 ⁷⁶ ; 26,1 ⁸⁰	0,12 ± 0,005
Antocianinas Totais (mg EC3G) ²	23,44 ± 0,85	7,6 ³¹⁰ ; 37,5 – 113,4 ³⁸ ; <i>90,2⁹⁷</i>	1,17 ± 0,04
Cianidina-3-soforósido (mg EC3G) ²	18,89 ± 0,60	4,5 ³¹⁰ ; 11,1 ⁷¹ ; 22,4 ⁸⁰ ; 24,9 ⁶⁷ ; <i>25,4⁷⁶; 29,2⁴⁸</i>	0,94 ± 0,03
Cianidina-3-glucósido (mg EC3G) ²	2,44 ± 0,05	3,9 ⁷⁶ ; 5,7 ⁸⁰ ; 7,0 ⁶⁷ ; <i>12,5⁶⁶</i>	0,12 ± 0,003
Pelargonidina-3- soforósido (mg EC3G) ²	1,04 ± 0,10	<i>0,06⁷⁶; 1,1⁶⁷</i>	0,05 ± 0,005
Pelargonidina-3-glucósido (mg EC3G) ²	0,04 ± 0,008	<i>0,12⁷⁶; 0,4⁶⁶; 0,48⁷¹; 7,0⁶⁷</i>	0,002 ± 0,0004
Cianidina-3-rutinósido (mg EC3G) ²	0,85 ± 0,08	0,8 ⁸⁰ ; 2,3 ⁷⁶ ; 2,8 ⁶⁷	0,04 ± 0,004
Pelargonidina-3-glucosil-rutinósido (mg EC3G) ¹	0,06 ± 0,01	<i>0,10⁷⁶; 0,2⁶⁷</i>	0,003 ± 0,001
Pelargonidina-3-rutinósido (mg EC3G) ¹	0,12 ± 0,006	<i>0,005⁷⁶; 0,2⁷⁶</i>	0,008 ± 0,003
Ácido elágico total (mg) ¹	1,80 ± 0,01	0,06 ⁶⁷ ; <i>0,6³¹⁰; 4,1⁹⁴</i>	0,09 ± 0,001

DP – desvio- padrão; EAG – equivalentes de ácido gálico; EC – equivalentes de (+) – catequina; EC3G – equivalentes de cianidina-3-glucósido; EAT – equivalentes de ácido tânico; dados da bibliografia a traço fino correspondem a extratos à base de acetona; dados da bibliografia a traço grosso itálico correspondem a extratos à base de metanol; a cinzento e a traço grosso extratos à base de outros extratantes; ¹ – avaliado por técnicas espectrofotométricas; ² - análise por HPLC; * - somatório das 7 antocianinas quantificadas.

Tabela I.17 Atividade antioxidante *in vitro* do extrato metanol:acetona (50:50, v/v) (n=3, Média ± DP)

PARÂMETRO	/100 G DE FRAMBOESA	DADOS DA BIBLIOGRAFIA /100 G DE FRAMBOESA	/ mL DE EXTRATO DE FRAMBOESA
ORAC (μmol CATE)	1277 ± 38	2870 ⁵³ ; 1849 ⁸⁰ ; 4925 ¹²⁰	63,9 ± 1,9
HORAC (μmol CAEAC)	529 ± 33	3430 ¹²⁰ (*) 4765 ¹²⁰	26,5 ± 1,7
(μmol CATE)			

CAET – capacidade antioxidante equivalente de Trolox; CAEAC – capacidade equivalente de ácido cafeico; DP – desvio-padrão; *Conversão do valor original para μmol CAEAC.

2.7 Estudo da composição fenólica e da atividade antioxidante *in vitro* da amostra de framboesa usada no estudo de intervenção em humanos

A cultivar Amira foi selecionada para o estudo de intervenção nutricional em humanos (ENIH) (item 2.3.1). Entre Novembro e Dezembro de 2012 procedeu-se à amostragem de 40 kg de framboesas maduras desta variedade (320 embalagens de 125 g). Estes frutos foram distribuídos em amostras individuais de 150 g e congelados à temperatura de -20 °C até à realização do estudo em humanos (item 3, capítulo II).

As amostras disponibilizadas aos participantes no ENIH incluíam frutos produzidos no solo e em substrato, mantidos sob congelação (-20 °C) durante cerca de 6 meses. Das framboesas da cv. Amira disponibilizadas aos voluntários no ENIH foi constituída uma amostra representativa, da qual foi obtido um extrato metanol:água:ácido fórmico (79,9:20:0,1 v/v/v). Os resultados da caracterização deste extrato são apresentados na Tabela I.18. De um modo geral, os resultados obtidos apresentam-se dentro dos valores reportados na bibliografia. Os teores em fenóis totais, flavonóides totais, antocianinas totais e em taninos hidrolisáveis totais eram, como esperado, muito superiores aos obtidos para o extrato metanol:acetona (50:50 v/v). O teor deste extrato nas antocianinas maioritárias cianidina-3-soforósido e em cianidina-3-glucósido, embora dentro dos valores referidos na bibliografia, era igualmente muito superior ao do extrato metanol:acetona (50:50 v/v).

Neste trabalho não foi estudado o efeito da congelação durante um período tão longo, mas há dados descritos na literatura sobre este assunto, que mostram que o efeito da congelação prolongada sobre a composição fenólica da framboesa pode variar com o genótipo. Segundo González *et al.* os frutos congelados de uma cultivar eram mais abundantes em antocianinas totais que os frutos frescos (+ 22%)⁵¹. Pelo contrário, uma dada variedade apresentava um decréscimo de 12% no teor em fenóis totais⁵¹. Os frutos congelados das restantes três variedades exibiam teores em fenóis totais ligeiramente superiores (+ 1% a +15%) aos dos frutos frescos⁵¹.

A comparação da composição fenólica dos extratos metanol:água:ácido fórmico (79,9:20:0,1 v/v/v) das amostras da cv. Amira ENIH e Outono 2012, possibilitou uma avaliação do impacto da congelação prolongada das framboesas distribuídas aos voluntários no ENIH no teor em fenóis totais, flavonóides totais, antocianinas totais, taninos hidrolisáveis totais e taninos condensados totais (Figura I.14).

Tabela I.18 Teores em ácido ascórbico e composição fenólica de frutos de *Rubus idaeus* L. produzidos da cv. Amira (ENIH) e do respetivo extrato (n=3; média± DP).

PARÂMETRO	/100 g DE FRAMBOESA	DADOS DA BIBLIOGRAFIA ^(REF)	/ ML DE EXTRATO DE FRAMBOESA
Ácido Ascórbico (mg) ¹	22,3 ± 1,50	20,3 ³⁸ ; 22,3 ⁵²	-
FT (mg EAG) ¹	226,4 ± 6,87	183,1 – 297,7 ³⁸	0,57 ± 0,02
FLT (mg EC) ¹	46,6 ± 2,06	25,3 – 41,1 ⁷⁴	0,12 ± 0,005
AT (mg EC3G) ¹	51,6 ± 1,18	17,7 – 50,3 ³⁸	0,52 ± 0,01
THT (mg EAT) ¹	367,4 ± 3,06	166,1 ¹⁵	0,92 ± 0,008
TCT (mg EC) ¹	20,9 ± 0,04	17,7 ¹⁵	0,05 ± 0,0004
FT (mg EAG) ²	120,2 ± 25,36	118 – 212 ³⁸	0,30 ± 0,06
Antocianinas Totais (mg EC3G) ²	85,1 ± 16,63	37,5 – 113,4 ³⁸	0,21 ± 0,04
Cianidina-3-soforósido (mg EC3G) ²	55,0 ± 8,92	20,9 – 63,5 ³⁸ ; 7,2 – 39,6 ³⁰¹	0,14 ± 0,02
Cianidina-3-glucosilrutinosido (mg EC3G) ²	<0,4 (LD)	0,6 – 18,6 ³⁸ ; 0,5 – 10,1 ³⁰¹	-
Cianidina-3- glucósido (mg EC3G) ²	27,4 ± 6,52	4,4 – 25,2 ³⁸ ; 0,5 ³¹⁰ ; 5,1 – 72 ³⁰¹	0,07 ± 0,02
Cianidina-3-rutinosido (mg EC3G) ²	2,7 ± 1,19	0,7 – 10,1 ³⁸ ; 0,7 – 12,4 ³⁰¹ ;	0,007 ± 0,003
Elagitaninos Totais (mg EAG) ²	29,6 ± 7,87	59,8 – 146,5 ³⁸	0,07 ± 0,02
Sanguina H-6 (mg EAG) ²	29,6 ± 7,87	38,4 – 100,9 ³⁸ ; 38 ³¹⁰	0,07 ± 0,02
Lambertianina C (mg EAG) ²	<0,04 (LD)	21,8 – 53,6 ³⁸ ; 18,7 ³¹⁰	-
Ácido Elágico Total (mg EAE) ²	1,8 ± 0,01	0,7 – 1,4 ³⁸ ; 0,6 – 2,0 ³⁹ ; 0,6 ³¹⁰	0,005 ± 0,0003

AET – somatório do teor em ácido elágico e derivados; AT – antocianinas totais; DP – Desvio- padrão; EAG – equivalentes de ácido gálico; EC – equivalentes de (+) – catequina; EC3G – equivalentes de cianidina-3-glucósido; EAT – equivalentes de ácido tânico; ET – elagitaninos totais; FT – fenóis totais; FLT – flavonóides totais; LD – limite de deteção; ND – não detetado; THT- taninos hidrolisáveis totais; TCT – taninos condensados totais; ¹ método espectralométrico; ² método de HPLC.

A análise comparada dos dados da composição fenólica avaliada por métodos espectrofotométricos de ambos os extratos metanólicos acidificados da cv. Amira sugere que a composição fenólica destas amostras era semelhante pelo que a congelação prolongada não terá promovido uma redução importante nestes fitoquímicos. Os teores em antocianinas totais e em taninos hidrolisáveis totais do extrato das framboesas Amira usadas no ENIH eram superiores ao do extrato Amira Outono 2012 embora o teor em fenóis totais seja inferior, possivelmente resultado de um decréscimo no teor em vitamina C.

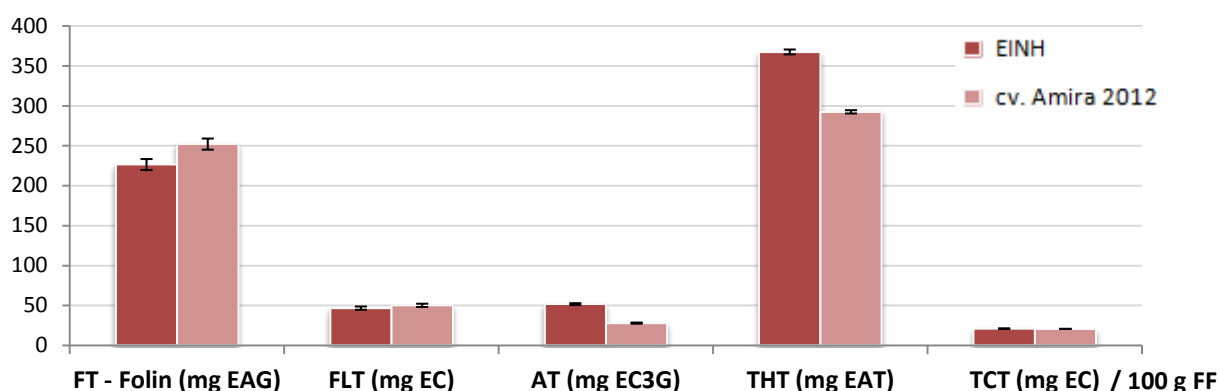


Figura I.14 – Composição fenólica de extratos metanol:água:ácido fórmico (79,9:20:0,1 v/v/v) framboesas da cv. Amira usadas no ensaio de intervenção nutricional em humanos (EINH) e de framboesas colhidas em Dezembro de 2012 (cv. Amira) (média \pm DP).

Tabela I.19 - Atividade antioxidante *in vitro* de framboesas da cv. Amira usadas no ensaio de intervenção em humanos (n=3, média \pm DP)

PARÂMETRO	/100 G DE FRAMBOESA	DADOS DA BIBLIOGRAFIA /100 g DE FRAMBOESA	/ML DE EXTRATO DE FRAMBOESA
ORAC (μ mol CATE) (μ mol TE)	3449 \pm 275	2870 ⁵³ ; 1849 ⁸⁰ ; 4925 ¹²⁰	862 \pm 68,8
HORAC (μ mol CAEAC) (μ mol CATE)	5378 \pm 337	3430 ^{120 (*)} 4765 ¹²⁰	1345 \pm 84,2

CAET – capacidade antioxidante equivalente de Trolox; CAEAC – capacidade equivalente de ácido cafeico; DP – desvio-padrão; * conversão

Os valores médios ORAC e HORAC do extrato de framboesas da cv. Amira usada no ENIH, e os respetivos DP, expressos em μmol CATE e CAEAC por 100g FF e por mL de extrato de FF apresentam-se na Tabela I.19.

Ao contrário do verificado com o extrato metanol:acetona (50:50 v/v) de framboesas da Primavera de 2010, esta amostra apresentava um valor ORAC dentro gama de valores encontrados na bibliografia e um valor HORAC superior ao reportado na bibliografia por Wu *et al*¹²⁰. Os valores ORAC e HORAC deste extrato eram, respetivamente, 1,7 e 9,2 vezes superiores aos do extrato metanol:acetona (50:50 v/v) usado nos estudos de avaliação da atividade biológica *in vitro* e em modelos animais de inflamação. Teores mais elevado em compostos fenólicos com atividade eletroquímica, nomeadamente em antocianinas, e em ácido ascórbico da amostra usada no ENIH poderão ter contribuído para estes resultados da atividade antioxidante *in vitro*.

2.8 Resumo dos resultados obtidos para os diferentes extratos

Ao longo deste primeiro capítulo foram caraterizadas diferentes cultivares de framboesa que foram utilizadas para diferentes fins. Numa tentativa de sistematizar todos os resultados obtidos, apresentam-se as Tabela I.20 que pretende compilar toda a informação obtida e tornar mais fácil uma comparação dos resultados.

Assim apresentam-se os resultados relativos à comparação da composição fenólica das quatro cultivares (Himbo-Top, Amira, Erika, Polka) ao longo de um ciclo produtivo e num período de 3 anos, e dos valores da composição fenólica e do teor em ácido ascórbico das amostras usadas na avaliação biológica da framboesa *in vitro* e em modelos animais e no ensaio de intervenção nutricional em humanos.

Em resumo:

O trabalho realizado neste capítulo permitiu escolher as melhores condições de preparação dos extratos de framboesa, utilizando uma solução extratante constituída por metanol:água:ácido fórmico (79,9:20:0,1 v/v/v). Esta foi a solução usada, exceto para o extrato preparado para os ensaios *in vitro* e com os animais, dado não ser possível fazer a sua

administração aos animais. Nessa parte do trabalho optou-se por preparar um extrato com metanol:acetona (50:50 v/v).

Tabela I.20 – Resumo dos dados do teor em ácido ascórbico e da caracterização fenólica de extratos de *Rubus idaeus* L.(por 100 g /framboesa)

PARÂMETRO	MÉDIA AO LONGO DE 1 OÜTONO DE PRODUÇÃO 4 CV. (MIN – MÁX)	MÉDIA DE 3 OÜTONOS DE PRODUÇÃO 4 CV. (MIN – MÁX)	MÉDIA DE 3 OÜTONOS DE PRODUÇÃO (AMIRA)	TESTES IN VITRO E ANIMAIS	EINH (AMIRA)
Ácido ascórbico (mg) ¹	–	–	–	16,8 ± 1,60	22,3 ± 1,50
FT (mg EAG) ¹	262,9 - 300,0	235,2 - 284,3	262,9 ± 50,69	171,0 ± 4,17	226,4 ± 6,87
FLT (mg EC) ¹	29,6 - 37,2	49,7 - 58,3	53,5 ± 6,95	24,5 ± 1,44	46,6 ± 2,06
AT (mg EC3G) ¹	–	44,1 - 60,3	53,8 ± 52,37	20,0 ± 2,76	51,6 ± 1,18
THT (mg EAT) ¹	365,1 - 439,3	347,1 - 377,3	374,2 ± 216,93	166,1 ± 0,19	367,4 ± 3,06
TCT (mg EC) ¹	–	20,7 - 20,9	20,8 ± 0,29	17,7 ± 0,25	20,9 ± 0,04
FT (mg EAG) ²	115,7 - 170,2	125,7 - 142,7	125,7 ± 29,63	–	120,2 ± 25,36
Ácido Gáhhico (mg AG) ²	<0,1 ^(LD)	<0,1 ^(LD)	<0,1 ^(LD)	2,40 ± 0,10	2,40 ± 0,10
AT (mg EC3G) ²	46,3 - 81,6	73,4 - 89,4	83,9 ± 55,42	23,44 ± 0,85	85,1 ± 16,63
Cianidina-3-soforósido	26,7 - 62,9	38,6 - 89,4	55,2 ± 35,05	18,89 ± 0,60	55,0 ± 8,92
Cianidina-3-glucosilrutínósido	<1,5 ^(LQ) - 19,4	<1,5 ^(LQ) - 16,5	<1,5 ^(LQ) - 4,7	<0,4 ^(LD)	<0,4 ^(LD)
Cianidina-3-glucósido	7,9 - 18,8	11,4 - 24,6	21,9 ± 18,13	2,44 ± 0,05	27,4 ± 6,52
Pelargonidina-3-glucosilrutínósido	<0,4 ^(LD)	<0,4 ^(LD)	<0,4 ^(LD)	0,06 ± 0,01	<0,4 ^(LD)
Pelargonidina-3-soforósido	<0,4 ^(LD)	<0,4 ^(LD)	<0,4 ^(LD)	1,04 ± 0,10	<0,4 ^(LD)
Cianidina-3-rutínósido	<0,4 ^(LD) - 4,7	<0,4 ^(LD) - 11,6	<0,4 ^(LD)	0,85 ± 0,08	2,7 ± 1,19
Pelargonidina-3-rutínósido	<0,4 ^(LD)	<0,4 ^(LD)	<0,4 ^(LD)	0,12 ± 0,006	<0,4 ^(LD)
Pelargonidina-3-glucósido	<0,4 ^(LD)	<0,4 ^(LD)	<0,4 ^(LD)	0,04 ± 0,008	<0,4 ^(LD)
Sanguina H6 (mg EAG) ²	–	26,4 - 38,7	31,0 ± 8,41	–	29,6 ± 7,87
ET (mg EAG) ²	34,9 - 42,8	26,8 - 72,6	49,7 ± 24,6	–	29,6 ± 7,87
AET (mg EAE) ²	–	1,65 - 2,62	1,56 ± 0,99	1,80 ± 0,01	1,90 ± 0,88

AET – somatório do teor em ácido elágico e derivados; AT – antocianinas totais; DP – Desvio- padrão; EAG – equivalentes de ácido gáhhico; EC – equivalentes de (+) – catequina; EC3G – equivalentes de cianidina-3-glucósido; EAT – equivalentes de ácido tânico; ET – elagitaninos totais; FT – fenóis totais; FLT – flavonóides totais; LD – limite de detecção; LQ – limite de quantificação; ¹ método espectrofotométrico; ² método de HPLC

Com base num conjunto de ensaios que envolviam fundamentalmente a determinação do conteúdo fenólico, procedeu-se á caracterização de diferentes amostras com diferentes objetivos. Assim:

(i) concluiu-se que o processo mais adequado para armazenamento das amostras num período de 3 dias seria a congelação;

(ii) conclui-se que ao longo do tempo de colheita normalmente considerado para estes frutos, as diferentes cultivares apresentavam algumas diferenças em termos de evolução dos parâmetros químicos;

(iii) a aplicação da espetrometria de massa MALDI-TOF revelou-se muito interessante no estudo da composição fenólica das amostras de *Rubus idaeus* L. pois permitiu uma obtenção rápida de espetros, possibilitando a identificação de 33 compostos. Será certamente uma abordagem a considerar quando o número de amostras em estudo for elevado, como p.ex., em situações de comparação de diferentes cultivares, em associação com metodologias de tratamento de um elevado número de dados. Para a quantificação, as amostras deverão ser analisadas por LC-MS/MS. Na perspetiva de trabalho futuro será de apostar na tentativa de identificação de mais compostos utilizando esta metodologia.

(iv) concluiu-se que a variabilidade observada em 3 anos de produção das 4 cultivares em estudo não permitia, utilizando os parâmetros químicos em estudo, discriminar as diferentes cultivares em função do seu genótipo;

(v) foram comparadas diferentes cultivares de framboesa tendo-se escolhido a Amira para os ensaios em humanos;

(vi) as amostras usadas nos ensaios *in vitro* e animais e as do EINH apresentavam uma composição química em compostos fenólicos semelhante;

(vii) as amostras usadas nos ensaios *in vitro* e animais e as do EINH apresentavam uma atividade antioxidante *in vitro* avaliada pelos métodos ORAC e HORAC.

Capítulo II.

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE BIOLÓGICA DA FRAMBOESA (*Rubus idaeus* L.)

Capítulo II. AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE BIOLÓGICA DA FRAMBOESA (*Rubus idaeus* L.)

As doenças crônicas, a principal causa de morte em todo o mundo, têm aumentando como consequência das modificações de estilos de vida, nomeadamente sedentarismo, níveis elevados de stresse e alterações na dieta. Segundo a OMS estas mortes prematuras podem ser prevenidas³²¹. A promoção de hábitos alimentares saudáveis, tais como o aumento da ingestão de frutas e produtos hortícolas, a principal fonte de polifenóis bioativos, constitui uma via para a proteção da saúde das populações³²².

Processos oxidativos e inflamatórios têm sido implicados na etiologia de NCDs. No organismo inflamado gera-se stresse oxidativo, suscetível de promover a libertação de mediadores inflamatórios e de RS adicionais, capaz de amplificar os efeitos pró-inflamatórios²⁰⁶.

Os resultados da caracterização química das amostras de framboesas analisadas evidenciam a abundância de antioxidantes naturais, nomeadamente antocianinas e elagitaninos, nestes frutos.

Em condições de inflamação e/ou de stresse oxidativo induzido, será que a intervenção de antioxidantes naturais da framboesa, nomeadamente de polifenóis, via administração/ingestão de framboesas ou de um extrato de *Rubus idaeus* L. rico em compostos fenólicos, pode reduzir os radicais livres libertados e atenuar a resposta inflamatória?

Neste capítulo II, apresentam-se e discutem-se os dados de estudos realizados no âmbito da avaliação da atividade biológica da framboesa que procuram dar respostas a esta questão. Numa primeira fase investigam-se potenciais atividades antioxidantes e anti-inflamatórias, *in vitro* em culturas celulares (*item 1*). Numa segunda fase apresentam-se estudos *in vivo* feitos em modelos animais de inflamação e usando extrato de *Rubus idaeus* L. produzidos em 2010, caracterizado no *item 2.6* do capítulo 1 (*item 2*). Finalmente, apresentam-se e analisam-se os resultados de um estudo de intervenção em humanos, saudáveis, relativo ao impacto da suplementação da dieta durante 3 semanas com

framboesas no stresse oxidativo e inflamatório pós-prandial induzidos pelo consumo de uma refeição hipercalórica rica em gordura e açúcares (*item* 3).

1. ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

1.1 Material e Métodos

1.1.1 Reagentes e Padrões

Avaliação da Atividade Antioxidante Intracelular – células de carcinoma de cólon humanas, Caco-2, da Deutsche Sammlung von Mikroorganismen (DSMZ) (Braunschweig, DE), meio de cultura RPMI 1640, soro fetal de bovino (FBS) e glutamina da Invitrogen (Gibco, Invitrogen Corporation, Paisley, UK); 2,2'-Azobis(2-amidinopropano) dihidrocloreto (AAPH), diacetato de 2-7- diclorofluoresceína (DCFH-DA), $\geq 97\%$, quercetina $\geq 98\%$ (HPLC) e tampão de fosfato padrão (PBS) da Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, US);

Avaliação da Atividade Antioxidante em Neutrófilos – os reagentes tampão fosfato salino (PBS), Solução Salina Equilibrada de Hank (HBSS), acetato de miristato de forbol (PMA), solução de azul de tripano a 0,4%, luminol, Dihidrorodamina 123 (DHR), citocromo c de coração de cavalo, cloreto de potássio, dehidroepiandrosterona (DHEA), e luciferina-luciferase foram adquiridos na Sigma Chemical Co. (St. Louis, US); o cloreto de sódio, sulfato de magnésio, ácido perclórico, bicarbonato de potássio e cloreto de cálcio foram adquiridos na Merck (Darmstadt, DE); o tris(hidroximetil)aminometano foi obtido da Riedel de Haën (Hanover, DE).

1.1.2 Amostras

Os estudos *in vitro* da atividade antioxidante intracelular e da atividade antioxidante em neutrófilos ativados foram realizados com o extrato concentrado de *Rubus idaeus* L. de metanol e acetona, (50:50, v/v), em água destilada Milli-Q[®], caracterizado no *item* 2.6 do capítulo I.

1.1.3 Equipamentos

Avaliação da Atividade Antioxidante Intracelular – leitor de microplacas fluorescência FL800 da BioTek Instruments (Winooski, VT, US);

Avaliação da Atividade Antioxidante Neutrófilos – leitor de microplacas de fluorescência Synergy HT da Bio-Tek Instruments (Winooski, VT, US).

1.1.4 Métodos

1.1.4.1 Avaliação da Capacidade Antioxidante Celular

A avaliação *in ex vivo* da CAC foi realizada em células humanas do carcinoma do cólon Caco-2 adquiridas na Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen, DSMZ, (Braunschweig, DE). As células foram cultivadas em meio de cultura RPMI 1640 e suplementadas com 10% de soro fetal bovino (FBS, do inglês ‘Fetal bovine serum’) e 2mM de glutamina. As células de *stock* foram mantidas em camadas, em frascos de cultura de 175cm² e incubadas em estufa à temperatura de 37°C, numa atmosfera humidificada com 5% de CO₂.

O procedimento de avaliação da CAC da amostra, um extrato concentrado de metanol e acetona (50:50 v/v) de *Rubus idaeus* L., em células Caco-2 envolveu uma etapa preparatória e a realização da experiência propriamente dita. A etapa preparatória compreendeu a sementeira das células numa placa de 96 poços a uma densidade de 2×10^4 células/poço, em 100 µL de meio de crescimento, e a muda do meio de incubação a cada 48h até que as células atingiram a confluência (72h). A experiência propriamente iniciou-se com a remoção do meio e lavagem das células duas vezes em PBS, solução tampão de fosfato padrão, para remoção de células não aderidas. De seguida, triplicados dos poços contendo as células diferenciadas foram incubados com 100 µL de diferentes concentrações da amostra e 25 µM de diacetato de diclorofluoresceína (DCFH-DA) diluídos em PBS. O DCFH-DA é um usado como indicador da formação intracelular de ROS. Em algumas células o meio foi removido e substituído por PBS contendo 600 µM AAPH, um indutor de *stresse* químico que gera a produção intracelular de ROS à temperatura de 37 °C. De seguida, a microplaca de 96 poços foi então colocada num leitor de microplacas de fluorescência FL800 da BioTek Instruments (Winooski, VT, US), a 37 ° C. A fluorescência emitida pela forma reduzida do DCFH-DA foi monitorizada e registada cada 5 minutos

durante 1 hora. Na leitura da microplaca usaram-se filtros de fluorescência para os comprimentos de onda de emissão $\lambda_{em}=530 \pm 25$ nm e de excitação de $\lambda_{ex}=485 \pm 20$ nm. Cada prato incluiu poços de controlo em triplicado (células tratadas com DCFH-DA e o oxidante AAPH) e poços branco (células tratadas com DCFH-DA sem o oxidante). A quercetina foi utilizada como um padrão. A CAA dos extratos de *Rubus idaeus* L. foi quantificada de acordo com o descrito por Wolfe & Lui¹²⁵. Finalmente, converteram-se os valores de EC50 em valores de CAC, expressa em micromoles de equivalentes de quercetina por g de framboesa ($\mu\text{mol EQ/g}$ framboesa), usando o valor EC50 médio de quercetina obtido a partir de três experiências.

1.1.4.2 Avaliação do *oxidative burst* pelos neutrófilos

A avaliação *in vitro* da capacidade antioxidante de um extrato de framboesa para inibir ROS e RNS produzidas por neutrófilos aquando do *oxidative burst* foi realizada em neutrófilos humanos por quimioluminescência, segundo o método descrito por Freitas *et al.*³²³. O estudo compreendeu o isolamento prévio de neutrófilos humanos e avaliação da capacidade antioxidante de um extrato de *Rubus idaeus* L. para inibir ROS e RNS produzidas por neutrófilos durante o *oxidative burst*.

O isolamento de neutrófilos humanos, foi realizado por meio de gradiente de densidade, como reportado por Freitas *et al.*³²³. As suspensões celulares obtidas continham mais do que 99% de neutrófilos e o controle da sua viabilidade mostrou que mais de 95% das células eram viáveis, excluindo as de azul de tripano a 0,4%. Os neutrófilos isolados foram mantidos em gelo até à utilização. O meio de incubação utilizado foi o meio de Glicose Tris (Tris 25 mM, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 1,26 mM, KCl 5,37 mM, MgSO_4 0,81 mM, NaCl 140 mM e 5,55 mM de D-glicose), recomendado por Freitas *et al.*³²⁴.

A sonda quimioluminescente de luminol tem sido exaustivamente estudada e utilizada para monitorizar a produção de espécies reativas por neutrófilos, nomeadamente de radicais anião superóxido ($\text{O}_2^{\bullet-}$), peróxido de hidrogénio (H_2O_2), hidroxilo (HO^{\bullet}), ácido hipocloroso (HOCl), monóxido de azoto (NO^{\bullet}) e anião peroxinitrito (ONOO^-)²¹⁶. A medição do *oxidative burst* dos neutrófilos foi realizada por quimioluminescência, monitorizando a oxidação induzida do luminol por ROS, segundo o procedimento descrito por Costa *et al.*²¹⁴. As misturas reacionais usadas neste ensaio continham neutrófilos (1×10^6 células/mL) e os

reagentes que se seguem, nas concentrações finais indicadas, num volume final de 250 µL: extrato de framboesa em estudo em diferentes concentrações, luminol (500 pM) e acetato de miristato de forbol (PMA; 160 nM). As células foram previamente incubadas com o luminol e com os compostos testados durante 5 minutos antes da adição de PMA e as medições foram realizadas a 37 ° C, sob agitação suave e contínua. As leituras cinéticas foram iniciadas de imediato, após a estimulação celular. Essas medidas foram realizadas no pico da curva que foi observado a cerca de 10 minutos. Os efeitos antioxidantes do extrato de *Rubus idaeus* L. foram expressos como a percentagem de inibição da oxidação do luminol. Os resultados foram expressos como média ± desvio padrão, a partir de, no mínimo, quatro experiências individuais, efetuadas em triplicado em cada experiência.

1.1.5 Tratamento dos Resultados

Os resultados da avaliação da CAC e do *Oxidative burst* pelos Neutrófilos foram comparados pelo método ANOVA de uma entrada seguido do teste pós-hoc de Bonferroni, tendo sido considerados significativos quando $p < 0,05$. A análise estatística foi realizada com a versão 5.0 do programa estatístico GraphPad da PRISM™ da GraphPad Software (San Diego, US).

1.2 Resultados e Discussão

1.2.1 Estudo da Capacidade Antioxidante Celular

A CAC *in vitro* do extrato de frutos de *Rubus idaeus* L. produzidos em 2010 foi avaliada em células da linhagem Caco-2, um modelo humano de absorção intestinal relevante^{325,326}. Este método possibilita a quantificação da atividade antioxidante potencial de fitoquímicos, de extratos de alimentos ou de suplementos dietéticos, de modo mais significativo em termos biológicos do que os ensaios de avaliação capacidade antioxidante química, *in vitro*, ORAC e HORAC. As células da linhagem Caco-2 têm a capacidade de se diferenciarem em monocamadas semelhantes a de eritrócitos polarizados com enzimas, transportadores e morfologia que mimetizam a das células epiteliais intestinais humanas¹⁶⁴. O stresse oxidativo celular foi induzido por um agente químico, o AAPH originando radicais peróxilo (ROO•). Os ROO• apresentam grande significado biológico, nomeadamente pelo facto de serem considerados intermediários importantes em vias metabólicas ligadas ao

stress oxidativo³²⁷. Nos organismos vivos, a probabilidade da formação de ROO[•] é elevada. No processo de peroxidação lipídica, por exemplo, formam-se RS muito reativos derivados do PUFA, incluindo radicais alquila peróxido (LOO[•])³²⁸. Os LOO[•] assumem um papel de destaque no processo de propagação da peroxidação lipídica que, por sua vez, gera mais RS com potencial impacto genotóxico e a nível cardiovascular. Outros ROO[•] com relevância biológica incluem radicais produzidos da oxidação do colesterol³²⁹ e de resíduos de aminoácidos na sequência da oxidação de proteínas³³⁰. O extrato de framboesa em estudo revelou-se eficiente no resgate deste radical *in vitro*, em condições artificiais (Tabela I.17, item 2.6, capítulo I). No entanto, ao contrário dos métodos ORAC e HORAC, o ensaio CAC considera aspetos da absorção, do metabolismo e da localização de compostos antioxidantes no interior das células. Na investigação da atividade antioxidante intracelular é importante que as linhagens celulares usadas mantenham as respostas funcionais ao stress oxidativo induzido. Culturas celulares da linhagem Caco-2 têm sido usadas com sucesso para estudar a biodisponibilidade e a conversão metabólica de antioxidantes dietéticos, nomeadamente de carotenóides e flavonóides³³¹. Estudos *in vitro* realizados com células desta linhagem evidenciaram que a nível celular, aqueles antioxidantes podem interromper e prevenir a propagação do radical peróxido e reduzir a peroxidação das membranas via redução das ROS produzidas ou resgate de ROS na célula³³¹.

Tabela II.1 Avaliação da atividade antioxidante celular *in vitro ex vivo* de um extrato metanol:acetona (50:50, v/v) de frutos frescos de *Rubus idaeus* L.

PARÂMETRO	/100 g de Framboesa	/ mL de Extrato de Framboesa
CAC (μmol EQ)	78	3,9

Legenda: CAC – atividade antioxidante celular; EQ equivalentes de quercetina.

O extrato de *Rubus idaeus* L. analisado apresentou uma CAC elevada: 78 μmol equivalentes de quercetina (EQ)/100g de framboesa ou 3,9 μmol de equivalentes quercetina/mL extrato (Tabela II.1). Importa notar que estas framboesas eram abundantes em compostos fenólicos (171,03 mg EAG/100 g de framboesa), sobretudo elagitaninos (166,13 mg EAT/100 g de framboesa) e antocianinas (23,44 mg EC3G/100 de framboesa; 7 antocianinas individuais representando 64% dos compostos fenólicos identificados e quantificados por HPLC-DAD-ED). Segundo Proteggente *et al.*⁸⁰, frutos ricos nestes flavonóides apresentam uma atividade antioxidante potencial elevada. A vitamina C, um dos

principais antioxidantes da framboesa^{8,73}, poderá igualmente ter contribuído para a elevada CAC observada. No entanto, este extrato continha apenas 0,43 mg de ácido ascórbico/mL (o procedimento de obtenção reduziu o teor deste constituinte a 49%) pelo que a sua ação neste estudo terá sido mais modesta.

Não foram recenseados dados na bibliografia respeitantes à avaliação da CAC pelo método adotado no presente estudo. Os resultados publicados relativos à quantificação da CAC de extratos de frutos de *Rubus idaeus* L. referem-se ao trabalho de Wolfe *et al.*¹⁵⁹. A avaliação da CAC foi realizada no modelo celular HepG2, uma linhagem de células cancerígenas do fígado humano. Ao contrário do modelo Caco-2, o uso de células da linhagem HepG2 no estudo da atividade antioxidante tem suscitado algumas críticas, nomeadamente o aumento da expressão da mRNA catalase e a obtenção de divisões celulares assimétricas suscetíveis de originar células disfuncionais³³¹. No entanto, no trabalho reportado por Wolfe *et al.* não há qualquer referência a este tipo de interferências. Esta equipa de investigadores norte-americanos estudou a atividade antioxidante potencial de 25 frutos vulgarmente consumidos nos US, incluindo framboesas, pelos métodos ORAC e CAC. O stresse oxidativo celular foi induzido por tetrabutilhidroperóxido (t-BHP) ou por H₂O₂ que se decompõem em radicais ROO[•] e HO[•], respetivamente. O conteúdo em fenóis totais foi determinado pelo método espectralométrico de Folin-Ciocalteu. As amostras de framboesas analisadas eram ricas em fenóis totais (239 ± 10 mg EAG/100 g de framboesas) e apresentavam valores de ORAC e de CAC elevados: 5292 ± 877 µmol de equivalentes Trolox/100g de frutos (7º valor mais elevado dos 25 frutos) e 33,6 ± 2,0 µmol EQ/100g de frutos (5º valor mais elevado), respetivamente. Os valores de CAC foram associados de modo significativo aos do conteúdo em fenóis totais e ao valor de ORAC. Á semelhança dos dados reportados por Wolfe *et al.*, o resultado obtido no presente estudo (uma CAC elevada, em consonância com o valor ORAC previamente determinado), evidenciou que o extrato de *Rubus idaeus* L. analisado tem potencial para contrariar o stresse oxidativo que se instala num ambiente de inflamação.

1.2.2 Avaliação do *Oxidative burst* pelos Neutrófilos

Os neutrófilos são células que assumem um papel importante na inflamação aguda e crónica e na potenciação ou resolução de NCDs^{181,213}. Na resposta inflamatória aguda os

neutrófilos ativados são as primeiras células imunitárias a intervir no local inflamado, atuando como células fagocitárias e libertando ativamente fatores citotóxicos, nomeadamente ROS (O_2^- , H_2O_2 e OH^\bullet , entre outros), resultado da redução de O_2 , num fenómeno designado de *oxidative burst*^{212,332}. Neste âmbito, a modulação do *oxidative burst* dos neutrófilos pode contribuir para minimizar os efeitos nefastos de processos inflamatórios não sustentados.

De um ponto de vista mais mecanístico, na sequência da avaliação da eficácia da ação antioxidante intracelular de compostos antioxidantes exógenos do extrato de *Rubus idaeus* L. (item 1.3.1, cap. II), neste estudo investigou-se a capacidade destes constituintes para inibirem ativamente a resposta do *oxidative burst* de neutrófilos infiltrados no tecido lesionado. Os valores médios \pm desvio padrão do efeito inibidor do extrato de framboesa vermelha no *oxidative burst* de neutrófilos humanos apresentam-se na Figura II.1. Considerando os dados obtidos para as concentrações testadas determinou-se um IC_{50} de $4,3 \pm 1,1 \mu g \cdot mL^{-1}$. Este resultado não só corrobora o potente efeito antioxidante em meio celular verificado no ensaio da CAC (resgate de LOO^\bullet) mas também evidencia que o extrato de *Rubus idaeus* L. interferiu eficazmente com a função dos neutrófilos, inibindo a libertação de ROS deletérias, suscetíveis de amplificar os sinais de inflamação previamente estimulados.

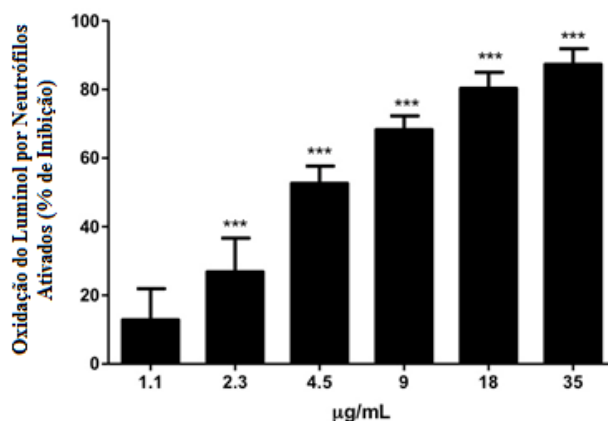


Figura II.1 - Efeito inibitório de um extrato de *Rubus idaeus* L. no *oxidative burst* em neutrófilos humanos.

*** $p < 0,001$ quando comparado com o ensaio controlo. Os valores são apresentados como média \pm DP

Denev *et al.*³³² estudaram a capacidade de um extrato de folhas de framboesa, rico em polifenóis (sobretudo taninos hidrolisáveis), intervir na ação de neutrófilos ativados pelo PMA através de técnicas de fluorescência e quimioluminescência, com uma sonda de luminol. Segundo o reportado neste trabalho, o extrato de folhas de *Rubus idaeus* L. inibiu significativamente a produção de ROS pelos neutrófilos resultado provavelmente de uma ação de resgate direto de ROS por parte dos constituintes do extrato, nomeadamente de polifenóis. Estes autores observaram uma correlação negativa entre o teor em fenóis totais e a resposta quimioluminescência-PMA ativada. A atividade da quercetina, um composto fenólico habitualmente presente em frutos frescos de *Rubus idaeus* L., na modulação da explosão respiratória dos neutrófilos foi demonstrada num estudo recente publicado em 2013²¹⁵. Ribeiro *et al.*²¹⁵, numa investigação realizada pela metodologia adotada no presente estudo, mostraram que a quercetina foi capaz de modular o *oxidative burst* de neutrófilos resultado sobretudo do grupo catecol dos seus anéis B.

Os resultados obtidos neste estudo incentivam a investigação de potenciais efeitos antioxidantes benéficos para a saúde humana, diretos ou indiretos, decorrentes do consumo de frutos de *Rubus idaeus* L. ou de extratos constituídos a partir destes, ricos em compostos fenólicos.

2. ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA EM MODELOS ANIMAIS

2.1 Material e Métodos

2.1.1 Reagentes e padrões

Os reagentes e padrões usados na avaliação da atividade anti-inflamatória *in vivo* em modelos animais foram os seguintes: ácido acético glacial e formaldeído da Carlo Erba Reagents (Sabadell, ES); ácido acético p.a., ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromano-2-carboxílico (Trolox), adjuvante de Freund completo (CFA), albumina sérica bovina (BSA), blocos de parafina, carragenina- λ , colagénio bovino tipo II (CII), indometacina, formalina, hematoxilina e eosina, paraformaldeído (PFA), peróxido de hidrogénio, tampão salino de fosfato padrão (PBS), Tris/EDTA e SIGMAFAST™ DAB com intensificador de metais da Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, US); cloreto de sódio e EntellanÒ da Merck S.A. (Miraflores, Algés, PT); Etanol 96% da Panreac (Barcelona, ES); solução fisiológica estéril

da B.Braun Portugal (Queluz de Baixo, PT); solução de Triton X-100 da BDH-Chemicals/VWR Internacional (Carnaxide, PT); ácido fórmico da VWR Internacional (Carnaxide, PT); anticorpos primários de coelho anti-COX2 da Cell Signaling (Cell Signaling #4842, 1:100, Cell Signaling Technology, Danvers, MA US) e anticorpos de rato anti-iNOS da BD Transduction Laboratories (BD Transduction Laboratories #610328, 1:100, New Jersey, US); *kits* comerciais para a avaliação dos biomarcadores alanina aminotransferase (ALT), aspartato aminotransferase (AST), creatina quinase (CK), ureia e creatinina num analisador automático Cobas Analyzer Roche® da Roche (Roche Portugal, Amadora, PT); pentobarbital de sódio da Eutasil (Sanofi Veterinária, Algés, Portugal).

2.1.2 Amostras

Os estudos relativos à avaliação da atividade anti-inflamatória aguda e crónica *in vivo*, em modelos animais, foram realizados com o extrato concentrado de *Rubus idaeus* L. de metanol e acetona, (50:50 v/v), em água destilada Milli-Q®, caracterizado no *item* 2.6 do capítulo I. Todos os solventes foram evaporados até à secura do extrato que foi posteriormente dissolvido em soro fisiológico.

2.1.3 Equipamento

Na avaliação da atividade anti-inflamatória aguda e crónica *in vivo* em modelos animais usámos os equipamentos seguintes: analisador automático Cobas Analyzer Roche® da Roche (Roche Portugal, Amadora, PT); pletismómetro ‘Digital Plethysmometer LE7500’ da Letica Scientific Instruments (Barcelona, ES); Raio- X: Consola Phillips Optimus ZBC6, consola e equipamento Phillips Bucky Diagnostic Phillips Device LeftOrtopantomografo OP100Ortoceph OC100Kodak DirectView CR Long – Lenght Vertical Apelem Baccara e processador de imagem Kodak DirectView System CR975- Leitor de Ip; Leitor de microplacas Kinetic microplate reader Vmax – Milenia – Kinetic Analyzer DPC.

2.1.4 Métodos

2.1.4.1 Estudo da atividade anti-inflamatória aguda *in vivo* num modelo animal

O estudo da atividade anti-inflamatória *in vivo* de um extrato de framboesa, em comparação com o efeito da indometacina e do trolox, foi realizado num modelo

experimental de inflamação aguda, o edema da pata induzido pela λ -carragenina, e avaliado por pletismografia. O modelo do edema da pata traseira do rato induzido pela λ -carragenina é um modelo adequado ao estudo da inflamação aguda local, largamente usado na avaliação da atividade anti-inflamatória de constituintes alimentares, de alimentos ou de extratos de alimentos^{15,333,334}.

A) Animais

Neste ensaio foram usados 34 ratos Wistar (Harlan Ibérica, Barcelona, ES) machos, com 5 semanas e peso compreendido entre 100 e 150 g. No Biotério de Manutenção da Faculdade de Farmácia da Universidade de Lisboa, os animais foram submetidos a um esquema de aclimação, de pelo menos duas semanas. Nesse período os animais foram mantidos à temperatura de 25°C, com ciclos de luz diários de 14 horas, com uma dieta de manutenção IPM-R20 da Letica (Barcelona, ES) e água *ad libitum*. 24h antes da realização da experiência suspendeu-se a dieta, mantendo-se apenas o livre acesso a água.

Os animais foram manuseados em conformidade com as regras relativas à proteção dos animais utilizados para fins científicos explicitadas no Decreto-Lei n.º 129/92, de 6 Julho, atos modificativos e relacionados (Decreto-Lei n.º 197/96, de 16 de outubro e Portaria n.º 1005/92, de 23 de outubro, alterada pelas Portarias n.ºs 466/95, de 17 de Maio, e 1131/97, de 7 de Novembro), que transpõem para o direito nacional a Diretiva n.º 86/609, seus atos modificativos e relacionados, e as recomendações da Comissão sobre o alojamento e os cuidados a prestar aos animais utilizados para fins experimentais e outros fins científicos (Recomendação n.º 2007/526/CE, JO L197 de 30/7/2007). A Comissão de Ética da Faculdade de Farmácia aprovou o protocolo deste estudo e a equipa de investigação compreendia dois elementos com habilitações para coordenar e conduzir as pesquisas com animais de modo independente, aprovadas pela Direção-Geral de Veterinária.

B) Protocolo Experimental

O edema da pata foi induzido com única uma injeção subplantar de 0,1 mL de uma solução de soro fisiológico estéril com 1% de λ -carragenina na pata posterior esquerda do rato. O volume da pata foi medido através método do volume deslocado num pletismómetro (Digital Plethysmometer LE7500 – Letica® Scientific Instruments, Letica, ES). Resumidamente, no início do ensaio a articulação da pata esquerda de cada animal foi

marcada com tinta resistente à água ao nível do maléolo, eminência óssea do tornozelo. O volume da pata foi medido imediatamente após a injeção da λ -carragenina (V_{0h} ou volume basal) e 6h depois (V_{6h}). No ato da imersão da pata posterior dos ratos no vaso do pletismómetro (Figura II.2), fez-se coincidir a marcação acima referida com a marcação existente no vaso. A variação do volume resultante da imersão da pata foi lida diretamente no pletismómetro. O aumento do volume da pata foi considerado como edema.

O ensaio compreendeu 34 animais previamente pesados e aleatoriamente divididos e distribuídos pelos seguintes grupos (Tabela II.2): (i) controlo negativo - animais sujeitos a uma injeção subplantar na pata posterior esquerda de 0,1 mL de soro fisiológico estéril e administrados com soro fisiológico (1 mL Kg⁻¹, i.p.) (n=6); (ii) grupo da carragenina (controlo positivo) - animais sujeitos a indução do edema da pata submetidos a uma injeção subplantar na pata posterior esquerda a 0,1 mL de uma dispersão a 1% de λ -carragenina em soro fisiológico e administrados com soro fisiológico (1 mL Kg⁻¹, i.p.) (n=6); (iii) grupo da framboesa o (EF_o) - animais submetidos à indução do edema da pata a indução do edema da pata pré-tratados com extrato de framboesa vermelha (15 mg Kg⁻¹, gavagem), 30 minutos antes da injeção com λ -carragenina (n=5); (iv) grupo da framboesa i.p. (EF_{i.p.}) - animais sujeitos à indução do edema da pata a indução do edema da pata pré-tratados com extrato de framboesa vermelha (15 mg Kg⁻¹, i.p.), 30 minutos antes da injeção com λ -carragenina (n=5); (v) grupo da indometacina - animais sujeitos à indução do edema da pata, pré-tratados com indometacina (10 mg Kg⁻¹, i.p.), 30 minutos antes da injeção com λ -carragenina (n=6); (vi) grupo do Trolox - animais submetidos à indução do edema da pata, pré-tratados com Trolox (10 mg Kg⁻¹, gavagem), 30 minutos antes da injeção com λ -carragenina (n=6). Os resultados individuais do edema da pata dos diferentes animais, expressos em percentagem, foram calculados pela expressão seguinte: edema da pata (%) = [(V_{6h} - V_{0h}) / V_{0h}] * 100.



Figura II.2. Avaliação do volume da pata no pletismómetro

Tabela II.2 – Protocolo experimental do estudo da atividade anti-inflamatória aguda do extrato de *Rubus idaeus* L.

GRUPOS	PRÉ-TRATAMENTO			INDUÇÃO DE INFLAMAÇÃO COM CARRAGENINA (minutos após pré-tratamento)	
	Produto administrado	Dose (mg/Kg)	Via de Administração	(S/N)	
CONTROLO NEGATIVO (n=6)	-	-	-	N	-
CONTROLO POSITIVO (n=6)	Soro Fisiológico	10	Oral	S	30
EF _o (n=5)	Extrato de Framboesa	15	Oral	S	30
EF _{ip} (n=5)	Extrato de Framboesa	15	Intraperitoneal	S	30
INDOMETACINA (n=6)	Indometacina	10	Intraperitoneal	S	30
TROLOX (n=6)	Trolox	10	Oral	S	30

Legenda: EF_o – Extrato de Framboesa administrado oralmente, por gavagem; EF_{ip} - Extrato de Framboesa administrado por via intraperitoneal; S- sim; N – não

2.1.4.2 Estudo do efeito anti-inflamatório crónico num modelo animal de artrite reumatóide

Nesta experiência utilizámos um modelo experimental de artrite reumatóide no rato, induzida pelo colagénio. O esquema deste protocolo apresenta-se na Tabela II.3.

Tabela II.3 - Protocolo experimental do estudo do efeito anti-inflamatório de um extrato de framboesa num modelo de artrite induzida pelo colagénio do tipo II.

GRUPO(S)	DIA 1	DIA 21	DIAS 23-34	DIA 35
(i) CONTROLO NEGATIVO (N=5)	1ª INJEÇÃO I.D. DE SORO FISIOLÓGICO	2ª INJEÇÃO I.D. DE SORO FISIOLÓGICO	SEM QUALQUER TRATAMENTO	AVALIAÇÃO DAS PATAS POR PLETISMOGRAFIA SACRIFÍCIO
(ii) CONTROLO POSITIVO (N=5)	INDUÇÃO DE ARTRITE			
	1ª INJEÇÃO DE CII EM FCA (100µL; 100 µg DE CII)	2ª INJEÇÃO DE CII EM FCA (100µL; 100 µg DE CII)	SEM QUALQUER TRATAMENTO	AVALIAÇÃO DAS PATAS POR PLETISMOGRAFIA SACRIFÍCIO
(iii) EF_{p.o.}	1ª INJEÇÃO DE CII EM FCA (100µL; 100 µg DE CII)	2ª INJEÇÃO DE CII EM FCA (100µL; 100 µg DE CII)	ADMINISTRAÇÃO DIÁRIA DE EXTRATO DE FRAMBOESA POR VIA ORAL (15 mg FT (EAG)/Kg)	AVALIAÇÃO DAS PATAS POR PLETISMOGRAFIA SACRIFÍCIO
(iv) EF_{i.p.}	1ª INJEÇÃO DE CII EM FCA (100µL; 100 µg DE CII)	2ª INJEÇÃO DE CII EM FCA (100µL; 100 µg DE CII)	ADMINISTRAÇÃO DIÁRIA DE EXTRATO DE FRAMBOESA POR VIA ORAL (15 mg FT (EAG)/Kg)	AVALIAÇÃO DAS PATAS POR PLETISMOGRAFIA SACRIFÍCIO

ID – intradérmica; I.P. e i.p. – intraperitoneal; p.o. – oralmente, por gavagem

A) Animais

Neste ensaio foram usados 20 ratos Wistar (Harlan Ibérica, Barcelona, ES) machos, com peso compreendido entre 290 e 325g. Os animais foram tratados segundo as normas já referidas anteriormente.

B) Protocolo Experimental

O protocolo experimental foi realizado ao longo de 35 dias e compreendeu a indução da artrite pelo colagénio tipo II bovino (CII), injetando nos ratos adjuvante completo de Freund (CFA, abreviatura do inglês *Complete Freund's adjuvant*) com CII segundo o descrito por Szabó *et al.*³³⁵ e Cuzzocrea *et al.*²⁴⁶, e o desenvolvimento da experiência propriamente dita (Tabela II.2). Brevemente, o CFA foi preparado pela adição de *Mycobacterium tuberculosis* H37Ra numa concentração de 2 mg.mL⁻¹. O CII foi dissolvido em ácido acético 0,01 M numa concentração de 2 mg.mL⁻¹, permanecendo sob agitação durante a noite, à temperatura de 4°C. O CII dissolvido foi congelado a -70°C até à sua utilização. Antes da injeção o CII foi emulsionado em igual volume de CFA.

Os animais foram identificados, pesados e aleatoriamente distribuídos pelos 4 grupos seguintes: (i) controlo negativo no qual não foi induzida artrite (n=5); (ii) controlo positivo, apenas com indução da artrite pelo CII (n=5); (iii e iv) grupos com indução de artrite e posterior administração do extrato de framboesa normalizado, oralmente, por gavagem, e por via intraperitoneal, respetivamente (EF_{po}; 15mg FT (EAG)/Kg; n=5; e EF_{ip}; 15mg FT (EAG)/Kg; n=5). No dia 1 iniciou-se o processo de indução da artrite pelo CII em FCA. Os animais dos grupos ii a iv foram injetados intradermicamente na base da cauda com 100 µL da emulsão de CII em FCA (contendo 100 µg de CII). No 21º dia foi administrada a 2ª injeção da emulsão de CII em FCA aos mesmos animais, nas mesmas condições. No 23º dia iniciou-se o tratamento diário dos animais dos grupos iii e iv com o extrato de framboesa, administrado na dose de 15 mg/Kg de peso vivo, oralmente por gavagem e por via intraperitoneal, respetivamente. Este tratamento foi mantido até ao 34º dia do estudo. Pelo contrário, nos dias 1 e 21 os ratos do grupo i foram injetados com soro fisiológico na base da cauda, por via intradérmica. Do dia 23º ao 35º os ratos dos grupos i e ii foram administrados oralmente, por gavagem, com 1 mL de soro fisiológico estéril. A avaliação clínica da artrite nos animais foi realizada diariamente, segundo o descrito por Szabó *et al.*³³⁵. No 35º dia procedeu-se à avaliação da severidade clínica da artrite através da medição do aumento de volume da pata dos animais, por pletismometria. Este aumento de volume, considerado o

volume do edema, foi calculado pela diferença entre os volumes da pata no 35º dia dos animais dos grupos ii a iv, e o volume da pata dos ratos do grupo i, avaliado no mesmo dia. Seguidamente efetuou-se a colheita de sangue, por punção cardíaca, em todos os animais, sob anestesia, após o que foram sacrificados. Finalmente as patas foram removidas, radiografadas e conservadas em formalina para posterior exame histológico. Nos soros fez-se a determinação de biomarcadores conforme está descrito seguidamente.

C) Preparação dos soros e ensaios bioquímicos

O sangue recém-colhido foi transferido para tubos BD Vacutainer® SST® II Advance®, com gel separador e ativador de coágulo (3 × 5 mL; BD Diagnostics – Preanalytical Systems, Oxford, UK), e foi centrifugado a 3000 rpm durante 10 min, à temperatura ambiente, para separar o soro da fração celular. Os soros obtidos foram separados e preparados para o doseamento dos níveis séricos de marcadores bioquímicos. Os marcadores bioquímicos avaliados foram os seguintes: Alanina Aminotransferase (ALT, um marcador específico para danos no parênquima hepático) e Aspartato Aminotransferase (AST, um marcador de danos hepáticos não específico), para avaliar a função hepática; creatina quinase (CK, abreviatura do inglês *Creatine Kinase*), para avaliar danos neuromusculares; ureia e creatinina para medir e avaliar a função renal. Estes marcadores bioquímicos foram analisados num sistema analisador semiautomático COBAS Analyzer Roche® (Roche Sistemas de Diagnósticos, Lda., Amadora, PT).

Alanina aminotransferase

A determinação quantitativa da atividade catalítica da ALT no soro dos ratos foi avaliada pelo método cinético (UV) *in vitro* ALT (ALAT/GPT) IFCC da Roche Diagnostics GmbH (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, DE), no analisador automático Cobas Analyzer Roche® da Roche, segundo as instruções do fornecedor. Esta técnica baseou-se na absorvidade molar. Este método baseia-se numa reação de transferência de um grupo amina entre a L-alanina e o α -cetoglutarato, catalisada pela ALT, com obtenção de piruvato e de L-glutamato. Seguidamente o piruvato, na presença da enzima lactato desidrogenase (LDH), reagiu com o dinucleótido de nicotinamida e adenina (NADH, do inglês ‘nicotinamide adenine dinucleotide’), reduzindo-se a L-lactato enquanto o NADH se oxida a NAD^+ . A velocidade desta oxidação, avaliada fotometricamente ao c.d.o. de 340 nm, é

proporcional à atividade da ALT na amostra. A concentração da ALT, expressa em U/L, foi calculada automaticamente no aparelho.

Aspartato-aminotransferase

A determinação quantitativa da atividade da AST no soro dos ratos foi avaliada pelo método cinético (UV) *in vitro* AST (ASAT/GOT) de acordo com o método da Federação Internacional de Química Clínica, IFCC, sem ativação por fosfato de piridoxal da Roche Diagnostics GmbH (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, DE), no analisador automático Cobas Analyzer Roche® da Roche. O método foi realizado segundo as instruções do fornecedor. Em resumo, a AST presente na amostra catalisa a transferência de um grupo amina entre o aminoácido L-aspartato e o cetoácido α -cetoglutarato para formar oxaloacetato e L-glutamato. O oxaloacetato, na presença da malato desidrogenase (MDH), reage com a NADH, reduzindo-se a L-malato enquanto a NADH se oxida a NAD⁺. A taxa de oxidação da NADH, avaliada fotometricamente ao c.d.o. de 340 nm, é diretamente proporcional à velocidade da produção de oxaloacetato e, portanto, à atividade catalítica da AST. A atividade catalítica da ALT, expressa em U/L, foi calculada automaticamente no aparelho.

Creatina quinase

A determinação quantitativa da atividade da CK no soro dos ratos foi avaliada pelo método cinético (UV) *in vitro* CK de acordo com o método da Federação Internacional de Química Clínica, IFCC, sem ativação por fosfato de piridoxal da Roche Diagnostics GmbH (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, DE), no analisador automático Cobas Analyzer Roche® da Roche. O método foi realizado segundo as instruções do fornecedor. Em resumo, a CK é ativada pela N-acetilcisteína. Numa primeira reação a CK ativada catalisa a desfosforilação de creatina fosfato para creatina e ATP. Numa reação acoplada catalisada pela hexoquinase, a glucose é fosforilada pelo ATP para formar D-glucose-6-fosfato. Finalmente a glucose-6-fosfato-desidrogenase catalisa a oxidação da glucose-6-fosfato pelo NADP⁺ para formar 6-fosfogluconato e NADPH. A taxa de formação da NADPH avaliada fotometricamente ao c.d.o. de 340 nm, é diretamente proporcional à atividade catalítica da CK. A atividade catalítica da CK, expressa em U/L, foi calculada automaticamente no aparelho.

Ureia

A quantificação da ureia no soro dos ratos foi avaliada pelo método colorimétrico *in vitro* UREAL da Roche Diagnostics GmbH (kit nº de Série – 04657616 190; Lote 686 048-01) (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, DE), no analisador automático Cobas Analyzer Roche® da Roche, segundo as instruções do fornecedor. Brevemente, a ureia da amostra é hidrolisada pela urease para formar amônio e carbonato. De seguida, o α -cetoglutarato reage com a amônia, na presença de glutamato desidrogenase e de 2 moles de NADH obtendo-se o aminoácido L-glutamato e NAD^+ . A taxa de decréscimo na concentração de NADH, avaliada fotometricamente a 340 nm, é diretamente proporcional à concentração de ureia na amostra. A concentração da ureia da amostra, expressa em mg/dL, foi calculada automaticamente no aparelho.

Creatinina

A determinação quantitativa da atividade da creatinina (CRE) no soro humano foi avaliada pelo método colorimétrico *in vitro* baseado na reação de Jaffé, CREJ da Roche Diagnostics GmbH (kit nº de Série – 05401755 190; Lote 675 555-01) (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, DE), no analisador automático Cobas Analyzer Roche® da Roche, segundo as instruções do fornecedor. Em meio alcalino, a creatinina da amostra reage com ácido pícrico para produzir um complexo amarelo-avermelhado. A taxa de formação do corante (intensidade da cor), medida pelo aumento da absorvância a 512 nm, é diretamente proporcional à concentração de creatinina na amostra. A concentração da creatinina, expressa em mg.dL^{-1} , foi calculada automaticamente no aparelho.

D) Avaliação histológica da artrite

Como referido anteriormente no 35º dia, os animais foram sacrificados sob anestesia, e as patas e os joelhos foram removidas e fixadas em formalina para exame de microscopia de luz. Amostras de tecidos articulares do joelho foram obtidos no final do período experimental e foram fixadas em solução de paraformaldeído (PFA) em solução salina de tampão fosfato 0,1 M (PBS, pH 7,4) (10 % v/v), à temperatura ambiente. Antes da desidratação e da inclusão em parafina, procedeu-se à descalcificação das amostras em ácido fórmico (10 %), por um período mínimo de 8 dias. As amostras foram posteriormente desidratadas utilizando gradientes de etanol e incluídas em blocos de parafina, seguindo o corte em 3 μM . Todas as secções foram desparafinadas com xileno e hidratadas em soluções progressivamente menos concentradas de etanol. A hidratação foi finalizada com água

destilada. Seguidamente, as amostras foram coradas com hematoxilina/eosina, desidratadas, diafanizadas e colocadas num fluido de montagem. Seguidamente realizou-se o exame microscópico. Todas as secções foram observadas num microscópio óptico com lentes 10x e 40x e fotografadas. A análise de microscopia de luz foi realizada num microscópio óptico Zeiss com uma câmara fotográfica Leica DFC490 da Leica Microsystems (Wetzlar, DE), equipada com um programa informático de captura de imagens Leica IM50 da Leica Microsystems (Wetzlar, DE). O exame histológico foi realizado por investigador que desconhecia o protocolo aplicado aos animais descrito previamente (alínea B, protocolo experimental). O exame histológico compreendeu a avaliação das peças e a classificação das características morfológicas observadas segundo uma escala com uma pontuação de 0-3, onde 0 = nenhum dano, 1 = edema, 2 = células inflamatórias e 3 = reabsorção óssea.

E) Imunocitoquímica para iNOS e COX-2

Depois do sacrifício, os animais foram perfundidos com PBS, seguido pelo mesmo tampão contendo 4% de PFA. Os tecidos fixados foram pós-fixados em 4% de PFA em PBS durante 72 h à temperatura ambiente, descalcificados, desidratados em séries de etanol graduado e embebidos em parafina. Após coloração com hematoxilina-eosina foram observadas características histopatológicas presentes em amostras articulares de joelho, nomeadamente inflamação, formação de *pannus*, danos na cartilagem e de reabsorção óssea. Para a imunocoloração, secções de 6 mm foram sujeitas à recuperação de antigénios, em tampão de citrato 20 mM com 1,5% de H₂O₂, durante 15 min. à temperatura ambiente no escuro, incubadas durante 10 min em tampão Tris / EDTA a 84 ° C e bloqueadas durante 1 h, à temperatura ambiente em 1% de albumina sérica bovina (BSA) em PBS. Seguidamente, foram usados os anticorpos primários, de coelho anti-COX-2 (Cell Signaling # 4842, 1:100) e de rato anti-iNOS (BD Transduction Laboratories # 610.328, 1: 100) em 0,5% de BSA em PBS, durante a noite a 4 ° C. Após lavagem em PBS, as secções foram incubadas durante 1 h à temperatura ambiente com anticorpos anti-coelho e anti-rato acoplados com peroxidase de rábano-silvestre (Santa Cruz Biotechnology, 1: 5000) em 0,5% BSA em PBS, incubadas durante 10 min em SIGMAFAST™ DAB com um intensificador de metais (Sigma), montado com EntellanÒ (Merck). As secções de tecido foram visualizadas com um microscópio de campo claro Axioskop. As imagens foram obtidas com uma câmara DFC 490 (Leica), transformadas em ficheiros de 8 bit e invertidas; a intensidade da coloração da

proteína foi medida como valor médio de intensidade. A expressão da COX-2 e da iNOS foi quantificada com o *software* ImageJ, versão 1,47.

F) Avaliação radiológica da artrite

Os ratos foram todos anestesiados com pentobarbital sódico (45 mg/kg, por via intraperitoneal) e colocados numa caixa de exame radiográfico, a uma distância de 90 cm da fonte de raios-X. A radiografia das patas posteriores dos animais, normais e artríticas, foi realizada utilizando uma máquina de raios-X, com uma exposição de 40 kW para 0,01 segundos. O exame radiológico foi realizado por investigador que desconhecia o protocolo aplicado aos animais (alínea B, protocolo experimental). A avaliação radiológica da artrite compreendeu a análise das radiografias obtidas e a classificação das características morfológicas observadas utilizando uma escala com uma pontuação de 0 a 3, o *escore* radiológico, na qual 0 = sem dano ósseo, 1 = inchaço do tecido e edema, 2 = erosão nas articulações, e 3 = erosão óssea e formação de osteófitos.

2.1.5 Tratamento dos Resultados

Os tratamentos estatísticos relativos ao estudo dos efeitos anti-inflamatórios *in vivo* em modelos animais foram realizados utilizando o programa informático GraphPad PRISM™ (versão 5.0; GraphPad Software). Os resultados são expressos como média \pm erro padrão da média (EPM). A comparação estatística entre grupos foi calculada usando a análise de uma via da variância (ANOVA), seguida do teste post-hoc de Bonferroni. Em todos os casos, os valores de *p* menores que 0,05 foram considerados estatisticamente significantes.

2.2 Resultados e Discussão

2.2.1 Estudo da Atividade Anti-inflamatória Aguda no Modelo da Carragenina

O modelo do edema da pata induzido pela λ -carragenina em ratos é um modelo de inflamação aguda, reprodutível, muito usado na investigação de propriedades anti-inflamatórias de drogas anti-inflamatórias não esteroides^{220,221} e, mais recentemente, de alimentos³³⁴, extratos¹⁴¹ e constituintes alimentares com propriedades antioxidantes²⁵². No local da injeção, geralmente numa pata posterior dos animais, aquele flogístico induz

rapidamente edema, hiperalgia e eritema. A resposta inflamatória aguda é frequentemente quantificada pelo aumento do tamanho da pata (edema), que atinge o seu máximo algumas horas após a injeção²²¹, avaliado pelo método de deslocamento do volume num pletismómetro.

Na sequência dos trabalhos anteriores, estudámos a capacidade do extrato de framboesa rico com um perfil polifenólico caracterizado pela predominância de elagitaninos e antocianinas (item 2.6, capítulo I) e com uma concentração normalizada (5g de framboesas/mL), para reduzir/prevenir o edema induzido pela λ -carragenina na pata de rato. Importa realçar que a dose ensaiada, 15 mg de extrato/kg de peso vivo, pode ser traduzida para um consumo humano diário de 150 g de frutos frescos de *Rubus idaeus* L., 94% da porção unitária recomendada na Tabela Portuguesa de Composição de Alimentos^{336,31}. Os resultados obtidos com uma única administração de extrato de *Rubus idaeus* L. foram comparados com os relativos à indometacina, uma droga anti-inflamatória não esteroide clássica que inibe a COX e, consequentemente a produção de PG e leucotrienos, e ao Trolox, um potente antioxidante hidrossolúvel análogo da vitamina E (Figura II.3).

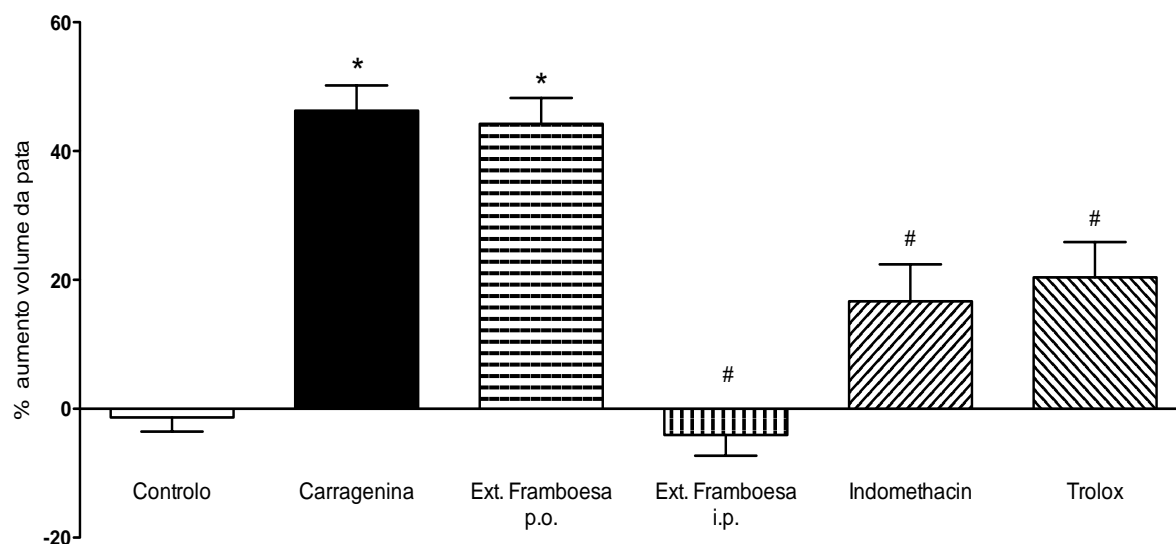


Figura II.3 – Efeitos do extrato de framboesa vermelha (i.p. e p.o.) no aumento do volume da pata induzido pela carragenina.

Os dados são apresentados como média ± erro padrão da média (EPM). * P <0,001 vs. grupo de controlo ; # P <0,001 vs. grupo carragenina.

Seis horas após a administração de λ -carragenina aos animais, todos os grupos tratados apresentaram redução do edema estatisticamente significativa, quando comparado com o grupo carragenina, com exceção do grupo tratado com extrato de framboesa dado oralmente (Figura II.3). Os animais pré-tratados com o extrato de framboesa administrado por via intraperitoneal não mostraram nenhum desenvolvimento do edema quando comparados com outros grupos, apresentando-se comparáveis ao controlo negativo. Os animais tratados com indometacina e trolox apresentaram uma redução significativa do desenvolvimento de edema, embora numa extensão menor, em comparação com o grupo administrado com o extrato de framboesa i.p.. O efeito observado na pata dos animais administrados i.p. com este extrato foi de maior magnitude do que o efeito anti-inflamatório observado com a indometacina, um anti-inflamatório inibidor da cicloxigenase, e com o trolox, um potente antioxidante. No entanto, quando o extrato foi dado oralmente não se verificou qualquer efeito no tamanho do edema provocado pela carragenina.

Tem sido relatado que a fase inicial da inflamação induzida pela λ -carragenina está relacionada com a produção de leucotrienos, histamina, factor de ativação de plaquetas e de produtos da COX, enquanto na fase tardia está associada à infiltração de neutrófilos e à produção de ROS derivadas de neutrófilos ativados, nomeadamente H_2O_2 e radicais $O_2^{\cdot-}$ e OH^{\cdot} , assim como à libertação de outros mediadores inflamatórios resultantes da ação daqueles leucócitos. O mecanismo de atuação proposto para o extrato explicitado anteriormente poderia explicar a redução significativa da formação do edema (resposta inflamatória) observado 6 horas após a administração do agente flogístico neste modelo.

A ação anti-inflamatória aguda do extrato de *Rubus idaeus* L. i.p. terá resultado da intervenção dos seus principais polifenóis e/ou antioxidantes naturais, nomeadamente elagitaninos e antocianinas e ácido ascórbico, no local da inflamação. Note-se que a administração do extrato aos animais por via intraperitoneal possibilitou a manutenção da estrutura daqueles constituintes, por evitar o efeito de primeira passagem, e portanto das suas propriedades benéficas. Pelo contrário, a introdução do extrato via oral, por gavagem, poderia não evidenciar tal efeito já que esta via implicaria a digestão *in vivo* do extrato ou seja uma absorção limitada e metabolização mais ou menos intensa daqueles constituintes fenólicos com produção de metabolitos diversos que podem não exibir as propriedades das moléculas originais.

2.2.2 Estudo da Atividade Anti-inflamatória Crônica num Modelo Animal da Artrite Reumatóide

Os resultados dos efeitos do extrato de framboesa ensaiado nesta experiência apresentam-se nas Figuras II.4 a II.9 e na Tabela II.4.

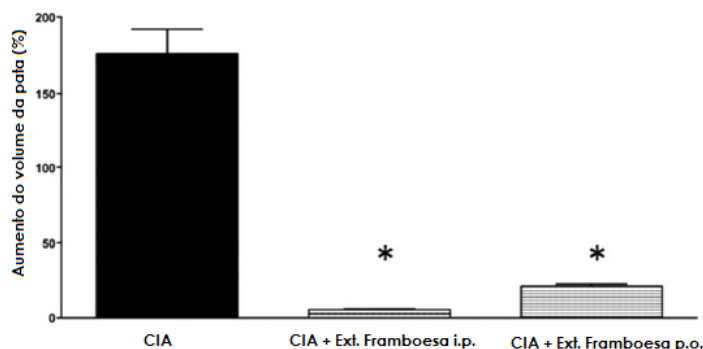


Figura II.4 - Efeitos do extrato de frutos de framboesa vermelha (i.p. e p.o.) no aumento do volume da pata associado à CIA.

CIA – Artrite induzida pelo colagénio; Os resultados são apresentados como média \pm EPM. * $P < 0,001$ vs. Grupo CIA.

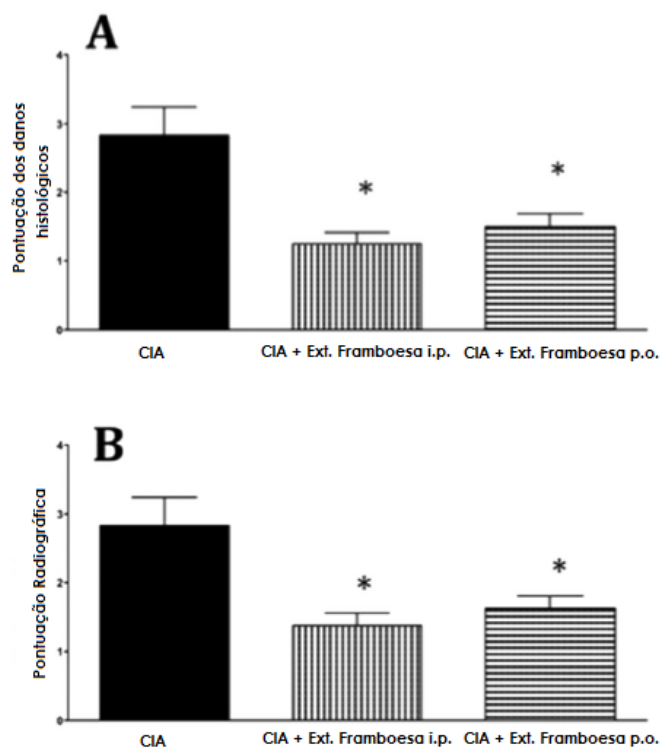


Figura II.5 - Efeito do tratamento com extrato de framboesa (i.p. e p.o.) na pontuação dos danos histológicos (A) e na pontuação radiológica (B) em animais com artrite induzida pelo colagénio (CIA).

Os valores apresentados são a média e o erro padrão da média. * $p < 0,001$ vs. tratados com veículo (CIA).

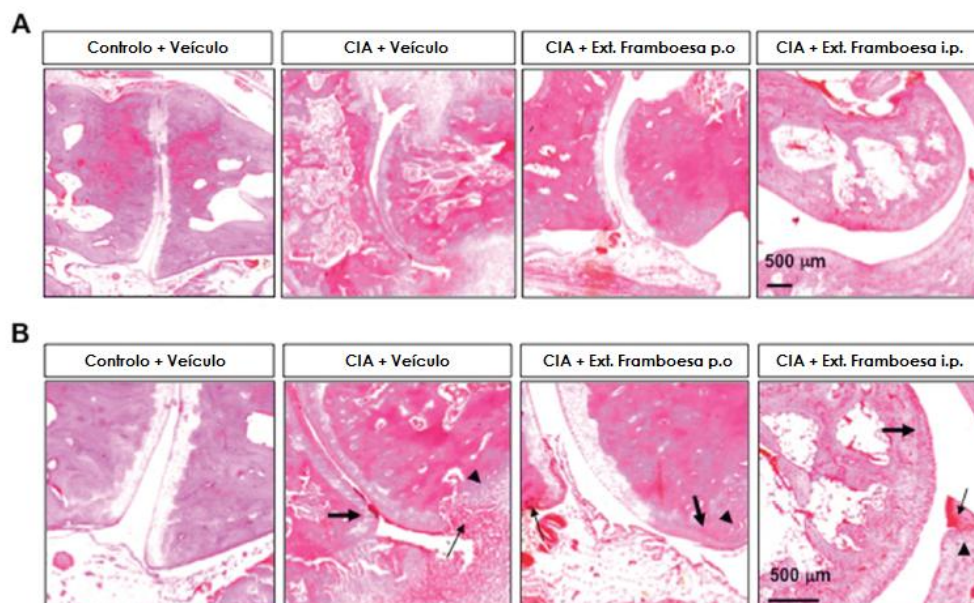


Figura II.6 - Cortes histopatológicos (A) e ampliações dos mesmos (B) relativos aos efeitos do extrato de framboesa vermelha num modelo animal de CIA, em ratos.

Os cortes histopatológicos de um rato controlo negativo, apresentam uma membrana sinovial normal, cartilagem não danificada, não evidenciando *pannus* ou reabsorção óssea na zona marginal. Os cortes histopatológicos de ratos controlo positivo em que a artrite foi induzida pelo colagénio (CIA), evidenciavam danos na cartilagem (seta grande), infiltração acentuada, *pannus* (seta pequena) e reabsorção óssea (cabeça da seta). Finalmente, os cortes histopatológicos de amostras provenientes de animais CIA, tratados com o extrato (*i.p.* ou *p.o.*), exibem uma sinóvia normal, cartilagem com pequenos danos (seta grande), apresentando uma redução de *pannus* (seta pequena) ou de reabsorção óssea (cabeça de seta) na zona marginal. Ampliação = X100 original



Figura II.7 - Progressão radiográfica da CIA nas articulações tibiotársicas.

(A) não existem evidências de alterações patológicas das articulações tibiotársicas de animais de controlo (normais). (B) As patas traseiras de ratos com CIA, no dia 35, demonstraram a reabsorção óssea e erosão conjunto bastante significativo. O tratamento com o extrato de framboesa fruta vermelha (15mg.kg^{-1}), administrado tanto por *p.o.* (C) como por *i.p.* (D) suprimiu significativamente a patologia articular e o edema de partes moles na pata posterior. As imagens de raios - X são representativas de pelo menos três experiências realizadas em dias experimentais diferentes.

Capítulo II. ATIVIDADE BIOLÓGICA DA FRAMBOESA (*Rubus idaeus* L.)

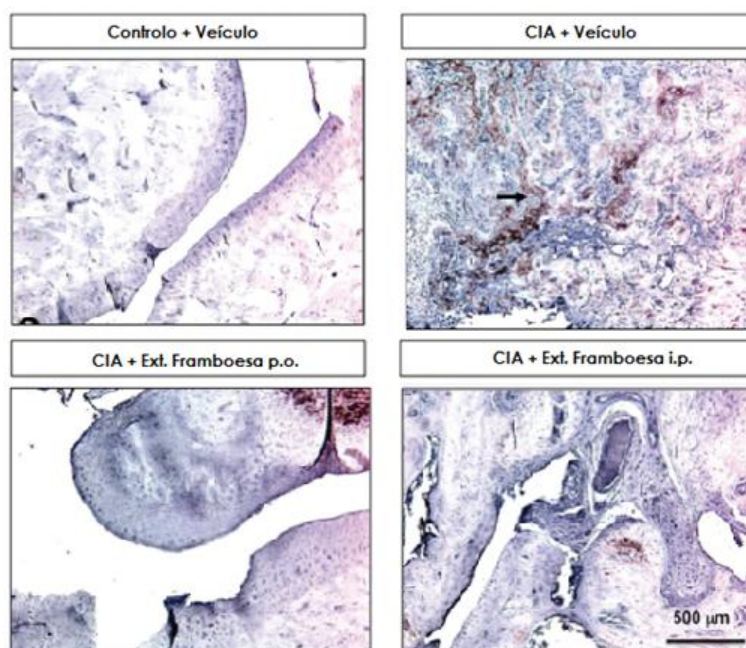


Figura II.8 - Redução da ativação COX-2 no modelo CIA resultado da administração do extrato de framboesa vermelha.

Os ratos foram tratados com o extrato (15 mg kg^{-1} , i.p. ou p.o., $n = 5$ por grupo) e as amostras imunocoradas para COX-2. Espécimes de um rato não tratado quase não exibem nenhuma expressão de COX-2, enquanto ratos artríticos tratados com veículo apresentaram uma produção maciça de COX-2, nomeadamente perto dos infiltrados (coloração castanha – seta grande). Os espécimes provenientes de animais tratados com o extrato de framboesa vermelha (15 mg.kg^{-1}), administrado por ambas as vias, oral e i.p., evidenciavam infiltração reduzida e coloração COX-2 (ampliação original x 100). A barra de escala é igual a $500 \mu\text{m}$.

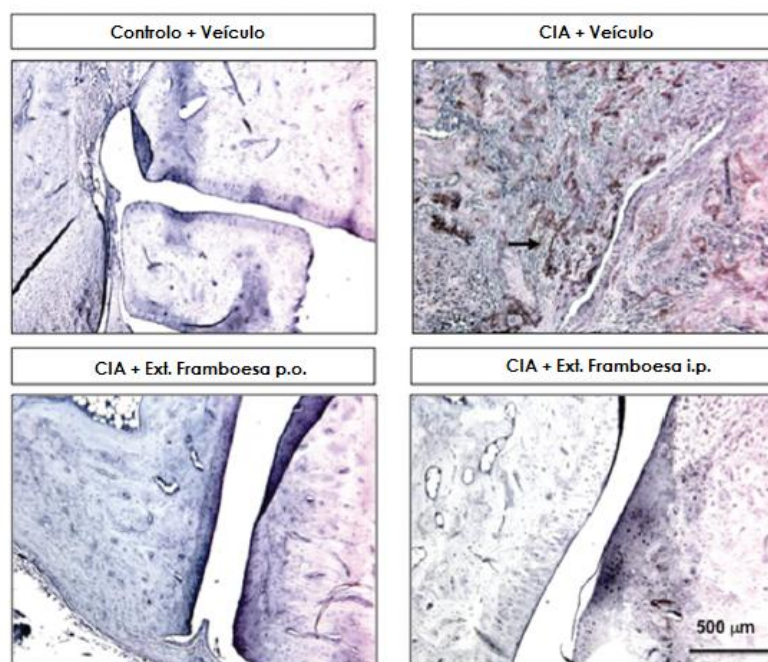


Figura II.9 - Redução da ativação iNOS no modelo CIA resultado da administração do extrato de framboesa vermelha.

Os ratos foram tratados com o extrato (15 mg kg^{-1} , i.p. ou p.o., $n = 5$ por grupo) e as amostras imunocoradas para iNOS. Espécimes de um rato não tratado quase não exibem nenhuma expressão de iNOS, enquanto ratos artríticos tratados com veículo apresentaram uma produção maciça de iNOS, nomeadamente perto dos infiltrados (coloração castanha – seta grande). Os espécimes provenientes de animais tratados com o extrato de framboesa vermelha (15 mg.kg^{-1}), administrado tanto por via oral como por ip, evidenciavam infiltração reduzida e coloração iNOS (ampliação original x 100). A barra de escala é igual a $500 \mu\text{m}$.

Nos ratos administrados com CII a CIA desenvolveu-se rapidamente. Os primeiros sintomas da doença, eritema e edema periarticular, foram observados nas patas posteriores dos animais depois do dia 21, após a 2ª injeção de CII em ratos dos grupos ii a iv. No dia 23 registou-se uma incidência de CIA de 100 % em todos os ratos imunizados com CII. Não foram observados sinais clínicos da CIA nas patas dianteiras de ratos durante o período de avaliação de 35 dias. O eritema e o edema das patas posteriores aumentaram em severidade e de forma dependente do tempo (dados não mostrados) com um índice máximo de artrite observado até o dia 35. O tratamento com o extrato de framboesa, administrado oralmente e por via i.p., foi capaz de reduzir de modo significativo a formação de edemas nas patas posteriores (Figura II.4) quando comparados com os animais não tratados.

No dia 35, a avaliação histológica revelou que espécimes de um rato controle não tratado (sem AR) apresentavam uma membrana sinovial normal, ausência de danos na cartilagem, de uma zona marginal com *pannus* ou de reabsorção óssea. Amostras de uma CIA num rato tratado com o veículo (com AR, sem tratamento) apresentavam sinovite grave, danos na cartilagem, infiltração marcada e *pannus* e reabsorção óssea. Pelo contrário, os espécimes provenientes de animais tratados via oral e i.p. exibiam sinóvia normal, pequenos danos na cartilagem, e uma reduzida zona marginal com *pannus* ou reabsorção óssea (Figuras II.5A e II.6). A avaliação do exame radiográfico das patas posteriores, 35 dias após a imunização com CII, revelou reabsorção da matriz óssea e formação de osteófitos nas articulações (Figuras II.5.B e II.6). Não foram encontradas evidências da patologia CIA em ratos controle (normais). Os exames radiográficos confirmaram que o extrato de framboesa vermelha, administrado por ambas as vias, foi capaz de reduzir significativamente o grau de reabsorção óssea, edema dos tecidos moles e formação de osteófitos, melhorando a função articular nos animais tratados.

Os resultados obtidos no presente estudo mostram que as evidências macroscópicas da CIA apareceram pela primeira vez como eritema e edema periarticular das patas traseiras. No dia 23 constatou-se que a incidência de CIA nos ratos injetados com CII foi de 100 %. A gravidade da CIA progrediu desde então até ao fim da experiência no dia 35. As radiografias relativas à progressão da CIA nas articulações tibiotársicas de animais dos 4 grupos considerados neste estudo apresentam-se na Figura II.7A a D, respetivamente. As radiografias obtidas revelaram um quadro clínico de artrite bem estabelecido, com

reabsorção focal do osso, formação de osteófitos na articulação tibiotársica e inchaço dos tecidos moles (animais do grupo ii, Figura II.7B). O tratamento de ratos com o extrato de framboesa (15 mg FT (EAG).kg⁻¹/dia), quer por via intraperitoneal quer oral, com o início no dia 23, retardou o desenvolvimento dos sinais clínicos até ao final da experiência (dias 24 a 35), nomeadamente dos relativos à patologia articular e ao edema de partes moles na pata posterior (Figura II.7C e D). A administração do extrato de *Rubus idaeus* L. aos animais (ratos dos grupos iii e iv) traduziu-se igualmente na obtenção de melhores pontuações histológicas e radiológicas das articulações do joelho e da pata que as dos animais doentes sem tratamento (ratos do grupo ii), (Figuras II.5A e II.5B).

Na artrite, como noutros estados inflamatórios, a COX-2 e a iNOS assumem um papel relevante como mencionado anteriormente. Os resultados da avaliação do impacto da administração do extrato de framboesa na redução da atividade das enzimas COX e iNOS encontram-se nas Figuras II.8 e II.9, respetivamente. Com o tratamento do extrato de *Rubus idaeus* L. a sinalização inflamatória, bem estabelecida nos animais com CIA, foi significativamente atenuada, não se observando uma produção ou libertação significativa de citocinas pró-inflamatórias suscetíveis de induzir a expressão da COX-2 (Figura II.8).

Do referido anteriormente, importa destacar que os neutrófilos são, das células que intervêm na fisiopatologia da AR, aquelas células que maior potencial citotóxico possuem dada a capacidade de libertarem enzimas de degradação e RS. Por exemplo, o ácido hipocloroso, um produto da enzima mieloperoxidase, assume um papel bem estabelecido na AR, na destruição da cartilagem³³⁷. Neste âmbito, considerando os resultados discutidos no *item* anterior, é possível inferir que o extrato de *Rubus idaeus* L. poderá ter um efeito inibidor da ação dos neutrófilos na articulação, reduzindo a lesão da mesma.

Finalmente, os dados respeitantes a marcadores bioquímicos avaliados nos soros dos animais sujeitos a administrações repetidas de extrato de *Rubus idaeus* L. (com o intuito de detetar eventuais efeitos em órgãos-alvo), concretamente AST e ALT (como marcadores da função hepática), creatinina e ureia (como marcadores da função renal) e CK (marcador de disfunção neuromuscular), mostraram que o extrato de framboesa não produz nas doses testadas e nos órgãos observados qualquer efeito significativo (Tabela II.4).

Tabela II.4 - Efeito do modelo de artrite reumatóide e da administração de extrato de framboesa nos marcadores bioquímicos de lesão: Alanina Aminotransferase (ALT), Aspartato Aminotransferase (AST), Creatina Cinase (CK), Ureia e Creatinina.

	ALT (U/L)	AST (U/L)	CK (U/L)	Ureia (U/L)	Creatinina (mg/dL)
Controlo (n=5)	66,2 ± 1,2	333,9 ± 55,8	1148 ± 138,4	39,3 ± 5,6	0,45 ± 0,05
CIA (n=5)	72,2 ± 1,9	345,4 ± 60,1	1204 ± 150,5	41,3 ± 6,3	0,48 ± 0,06
CIA + Framboesa p.o. (n=5)	69,1 ± 1,8	339,9 ± 58,2	1179 ± 145,7	43,7 ± 6,4	0,46 ± 0,08
CIA + Framboesa p.o. (n=5)	71,5 ± 1,6	340,7 ± 61,9	1190 ± 149,9	42,2 ± 5,9	0,47 ± 0,07

Em resumo,

As condições músculo-esqueléticas constituem a causa mais comum de incapacidade e de dores graves a longo prazo e uma das principais causas de afastamento dos locais de trabalho com implicações na quebra de produtividade³³⁸. Estas doenças são altamente prevalentes no nosso país e estão significativamente associadas a um comprometimento da saúde física e mental dos portugueses afetados²³⁵. Considerando os atuais estilos de vida e o aumento de longevidade da população, o impacto negativo destas doenças em termos de saúde pública tem tendência para aumentar. A AR é uma das principais destas doenças. No nosso país estima-se que esta doença afete cerca de 63.198 portugueses, sobretudo mulheres²³⁵. Estes doentes são os têm maior incapacidade funcional (social e profissional) e pior qualidade de vida²³⁵. Inatividade, incapacidade, causa de consultas, baixa médica e reforma antecipada são aspetos do impacto desta doença identificados em Portugal^{339,340}. No seu conjunto, todas as formas prematuras de abandono do trabalho (reforma antecipada, incapacidade e desemprego) causadas por doenças reumáticas traduzem-se, de acordo com dados do estudo EpiReumaPT, em 1.186.679 anos de trabalho perdidos³⁴¹. Os custos anuais indiretos resultantes apenas das situações de reforma antecipada foram estimados em

910.000.000 €³⁴². A AR, à semelhança de outras doenças reumáticas, está frequentemente associada a outra ou outras doenças crónicas (p.ex. doenças cardiovasculares e osteoporose), e a prevalência da multimorbilidade tem propensão para aumentar com a idade^{343,344}.

Os resultados apresentados estão em linha com o entendimento atual sobre os efeitos biológicos dos polifenóis e outros compostos antioxidantes contidos na framboesa, e a sua relevância para a saúde humana. Com este trabalho demonstramos, no nosso conhecimento pela primeira vez, a justificação mais provável para o mecanismo de proteção associado para uma dieta suplementada com extrato de framboesa, ou quantidades equivalentes de fruta fresca, para fornecer proteção significativa contra o desenvolvimento e a progressão de muitas patologias crónicas, como a artrite reumatóide. Ao considerar a translação do ambiente não-clínico para o clínico, a dose testada de 15mg FT (EAG)/kg de extrato traduziria ao consumo equivalente humano diária de 150 g de fruta fresca (framboesa) como demonstrado por Reagan-Shaw *et al.*³³⁶. Nenhum efeito adverso é esperado, não se identificaram interações de fármacos com alimentos e não foram observadas alterações significativas nos marcadores bioquímicos após a colheita de sangue no dia 35 de animais tratados e não tratados.

Termos alguns conhecimentos de variáveis de biodisponibilidade dos constituintes do extrato (como a cinética de absorção, distribuição e eliminação) irá facilitar a concepção de estudos clínicos e será um dos objetivos na continuação deste trabalho. O papel dos compostos aqui identificados na saúde humana ainda é uma área fértil de pesquisa. Com base no entendimento científico atual, este produto pode oferecer a grande oportunidade para a prevenção e/ou auxiliar de tratamento de várias doenças inflamatórias crónicas humanas. Este estudo demonstra que um extrato de framboesa com qualidade farmacêutica, ou a fruta fresca, poderiam servir como complemento ou uma fonte alimentar de compostos farmacologicamente ativos que poderiam ter um papel ativo em retardar a progressão da lesão inflamatória articular associada à artrite reumatóide. Isto é particularmente importante numa população idosa diagnosticada e já polimedicada que muito iria beneficiar desta terapia adjuvante ou de suplementação.

3. ESTUDO DO IMPACTO DA INGESTÃO DE FRUTOS DE *RUBUS IDAEUS* L., POR VOLUNTÁRIOS SAUDÁVEIS, NO STRESSE OXIDATIVO, METABÓLICO E INFLAMATÓRIO PÓS PRANDIAL, PROVOCADO PELO CONSUMO DE UMA REFEIÇÃO HIPERCALÓRICA, RICA EM AÇÚCAR E GORDURA

Como já referido anteriormente a ingestão aguda de refeições hipercalóricas ricas em gordura e/ou açúcar, para além de gerar valores elevados de glicemia e lipidémia pós-prandiais, provoca a produção de radicais livres em excesso gerando stresse oxidativo e também inflamatório com libertação de citocinas pró-inflamatórias na circulação sanguínea. Todos estes fatores podem estar na génese das doenças crónicas.

Tem sido atribuído um papel benéfico importante ao consumo de frutas e vegetais na prevenção destas doenças, que tem sido associado à grande variedade de antioxidantes (polifenóis e vitaminas) nestes alimentos.

Neste cenário, e como a framboesa é rica em compostos antioxidantes, não só antocianinas como outros compostos fenólicos e ainda vitamina C, pareceu interessante desenvolver o estudo que passaremos a descrever no ponto 3 deste capítulo II.

Neste estudo de intervenção nutricional em humanos, pretende-se estudar o efeito da ingestão de uma refeição hipercalórica, muito rica em gordura e açúcar, no stresse pós prandial metabólico, oxidativo e inflamatório, em voluntários saudáveis e também averiguar o impacto da ingestão diária de framboesas, durante 3 semanas, nos mesmos voluntários colocados nas condições descritas anteriormente.

3.1 Material e Métodos

3.1.1 Reagentes e padrões

Foram utilizados os seguintes reagentes e padrões: *kits* de ensaios imunoenzimáticos ELISA de fase sólida de alta sensibilidade Quantikine® da R&D Systems Inc. (Minneapolis, US), para o doseamento em humanos das citocinas TNF- α , IL-1 β e IL-6; *kits* de ensaios imunoenzimáticos ELISA de fase sólida da Mercodia® (Uppsala, SE), para o doseamento em humanos da LDL oxidase (LDLox); *kit* de ensaio colorimétrico imunoenzimático ELISA de fase sólida para o doseamento da capacidade antioxidante do soro, da Biovision Incorporated (Milpitas, US); *kits* comerciais Cobas c pack da Roche para a determinação dos

parâmetros bioquímicos glucose, triglicéridos, colesterol total, HDL e LDL, fosfatase alcalina, α -amilase, ureia, creatinina, alanina aminotransferase, aspartato aminotransferase, lactato desidrogenase e lipase C da Roche (Roche Portugal, Amadora, PT).

3.1.2 Amstras

No estudo de intervenção nutricional em humanos, a dieta dos voluntários saudáveis foi suplementada com framboesas maduras da cv. Amira (designadas de substância-teste) produzidas no Outono de 2012 na região de Odemira, na HEF. A caracterização química de uma amostra representativa dos frutos de *Rubus idaeus* L. disponibilizados aos participantes encontra-se no *item* 2.7 do capítulo I.

3.1.3 Equipamentos

Os equipamentos usados no estudo do impacto da ingestão de frutos de *Rubus idaeus* L. no stresse oxidativo e inflamação pós prandiais em voluntários saudáveis foram os seguintes: analisador automático Cobas Analyzer Roche® da Roche (Roche Portugal, Amadora, PT); Leitor de microplacas Kinetic microplate reader Vmax – Milenia – Kinetic Analyzer DPC; Espectrofotómetro, Spectrostar Omega, BMG Labtech, Germany e centrífuga refrigerada Biofuge Stratos da Haeraeus para a separação do soro e do plasma do sangue.

3.1.4 Métodos

3.1.4.1 Ensaio de intervenção nutricional em humanos

Este estudo do impacto da ingestão de framboesas no stresse oxidativo e inflamação pós prandiais em voluntários saudáveis é um estudo de intervenção nutricional com carácter exploratório, autocontrolado, constituído por um único grupo de indivíduos saudáveis. O período de intervenção compreendeu 23 dias consecutivos. O estudo foi aprovado pela Comissão de Ética da Faculdade de Farmácia da Universidade de Lisboa (data – 5 de Junho de 2012). O protocolo adotado satisfazia as recomendações de Helsínquia. A Figura II.10 apresenta uma representação esquemática das etapas do estudo.

Os participantes (n=12, 75% dos voluntários recrutados), estudantes e funcionários da Faculdade de Farmácia da Universidade de Lisboa, de ambos os sexos (mulheres – 8;

homens - 4) e com idades entre 20 e 55 anos, constituíram uma amostra de conveniência, não probabilística, da população-alvo – indivíduos adultos saudáveis. O recrutamento decorreu em Abril de 2013 e incluiu o preenchimento de um questionário relativo ao seu estado de saúde e hábitos (Anexo B).

Os voluntários selecionados encontravam-se, saudáveis, em boas condições físicas, sem doenças, intolerâncias ou alergias alimentares diagnosticadas, não eram grávidas ou aleitantes, nem eram consumidores regulares de framboesas. Estes indivíduos satisfaziam igualmente os restantes critérios de inclusão no estudo: eram não fumadores, não se encontravam sob medicação que interferisse com o estudo (medicamentos para diminuir colesterol, anti-inflamatórios, suplementos alimentares), não eram diabéticos e não apresentavam valores de glicemia basal > 110 mg/dL, tinham valores normais de pressão arterial, não tinham doenças inflamatórias nem outras doenças sistémicas e apresentavam um IMC entre 19 e 27 kg/m². Os voluntários incluídos no estudo preencheram e assinaram o consentimento informado (Anexo C) e receberam as instruções respeitantes aos alimentos que deveriam evitar consumir dois dias antes das colheitas de sangue (Anexo D). No dia do início do estudo os participantes preencheram o questionário pré-estudo (Anexo E) antes da primeira colheita de sangue.

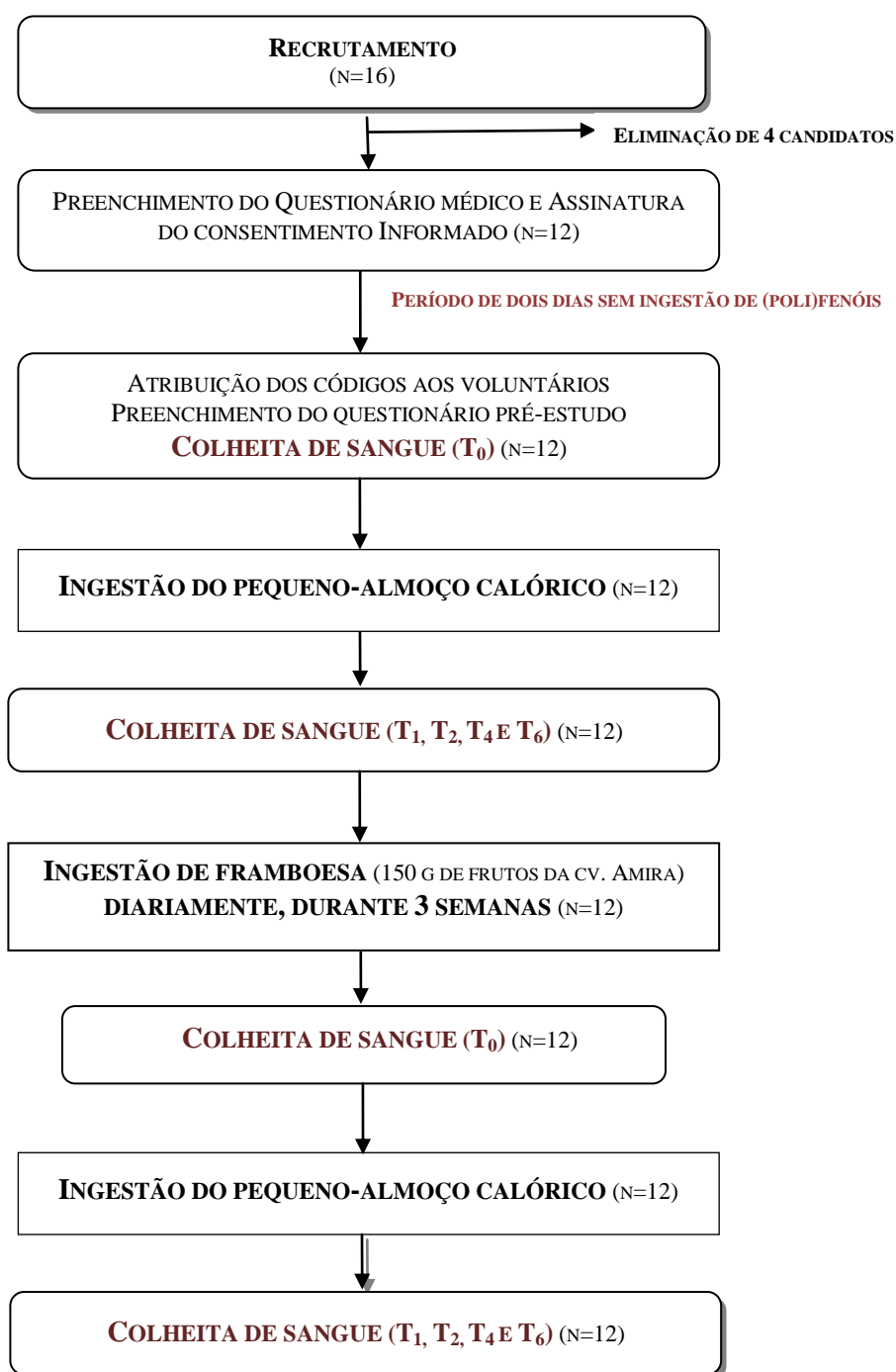


Figura II.10 - Diagrama de fluxo do estudo de intervenção nutricional em voluntários saudáveis

T₀ – jejum; T₁, 2, 4 e 6 – 1h, 2h, 4h e 6h após a ingestão do pequeno-almoço calórico

O estudo foi desenhado de modo a investigar em humanos saudáveis, o efeito da ingestão de uma refeição muito calórica, rica em gordura e açúcar (RRGA) nos níveis de

glicemia, triglicéridos, colesterol total, HDL, LDL, LDLox, CAT, TNF- α , IL-1 e IL-6 e que tipo de alteração provocaria o consumo crónico de 150 g de framboesas diariamente, durante 3 semanas, pelos mesmos indivíduos.

B) Refeição rica em gordura e açúcar (pequeno almoço)

O pequeno-almoço que passaremos a referir como refeição rica em gordura e açúcar (RRGA) era constituído por iogurte grego açucarado, croissant folhado com manteiga, queijo e fiambre e leite achocolatado, com um valor calórico muito elevado (1.308 Kcal) e é apresentado na Tabela II.5.

Optámos por uma refeição rica em gordura e açúcar e não só rica em gordura ou só rica em açúcar, por julgarmos ser esta a que melhor se enquadra nos hábitos alimentares dos nossos dias.

Tabela II.5 - Composição da refeição rica em gordura e açúcar

ALIMENTO	ENERGIA (Kcal)	PROTEÍNA (g)	HIDRATOS DE CARBONO (g)	AÇÚCARES (g)	LÍPIDOS TOTAIS (g)	AC. GORDOS SATURADOS (g)
Iogurte grego (125g)	192	4,6	14,4	14,4	12,5	7,8
Leite chocolate (200 mL)	145	6,8	24	24	2,4	1,4
Croissant (140g)	793	10,7	50	50	40,0	17,0
Manteiga (10 g)	73	0,05	0,06	0,06	8,1	5,8
Fiambre (40g)	42	7,2	0,2	0,2	10,2	3,6
Queijo (20g)	63,2	5,2	0,04	0,04	5,2	2,5
TOTAL	1.308,2	34,55	88,7	88,7	78,4	38,1

C) Suplementação nutricional com framboesas

A dieta dos voluntários foi suplementada diariamente, durante 3 semanas, com 150 g de framboesas maduras da cv. Amira produzidas no Outono de 2012 na região de Odemira, na HEF. A caracterização química de uma amostra representativa dos frutos de *Rubus idaeus* L. disponibilizados aos participantes encontra-se no *item 2.7* do capítulo I.

Escolheu-se a quantidade de 150 g de framboesa por dia por se considerar ser uma porção razoável para ser consumida numa dieta e também após ter sido feita a translação da dose para humanos³³⁶ baseada no teor de fenóis totais presentes na framboesa que mostraram efeito anti-inflamatório nos modelos animais de inflamação aguda e crónica estudados no *item 2* deste mesmo capítulo.

D) Colheita das amostras de sangue

O sangue recém-colhido foi transferido para tubos BD Vacutainer® SST® II Advance®, com gel separador e ativador de coágulo (3 × 5 mL; BD Diagnostics – Preanalytical Systems, Oxford, UK) para obtenção de soro e tubos com EDTA para obtenção do plasma. Todos os tubos foram devidamente identificados (nº do indivíduo, nº do tratamento, ponto temporal, data e centrifugados (3500 x g, 10 min, +4°C). O soro e plasma foram removidos e transferidos para criotubos devidamente identificados. A cada tubo adicionou-se um volume preciso de solução de armazenamento (20% ácido ascórbico e 0,1 % EDTA, pH 3,6) e o conteúdo foi bem misturado. Finalmente os tubos foram selados e congelados até à sua utilização.

E) Biomarcadores

Os soros obtidos foram separados e preparados para o doseamento dos níveis séricos de TNF- α , IL-1 β e IL-6, glicemia, triglicéridos, colesterol total, LDL, HDL, LDL oxidada (LDLox), capacidade antioxidante total do plasma CAT e também foram avaliados marcadores bioquímicos de algumas funções fisiológicas. Os marcadores bioquímicos avaliados foram os seguintes: Alanina Aminotransferase (ALT, um marcador específico para danos no parênquima hepático) e Aspartato Aminotransferase (AST, um marcador de danos hepáticos não específico), para avaliar a função hepática; creatina quinase (CK, abreviatura do inglês *Creatine Kinase*), para avaliar danos neuromusculares; ureia e creatinina para medir e avaliar a função renal. Estes marcadores bioquímicos foram analisados num sistema analisador automático COBAS Analyzer Roche® (Roche Sistemas de Diagnósticos, Lda., Amadora, PT).

3.1.4.2 Métodos de determinação dos biomarcadores

Capacidade Antioxidante Total

A capacidade antioxidante total do plasma foi avaliada pelo método colorimétrico *Kit* TAC da BioVision® (BioVision Inc., Milpitas, CA) (nºABIN411721). Este método é capaz de medir uma combinação de pequenas moléculas e de proteínas, apenas proteínas ou apenas pequenas moléculas, na presença de um composto designado de ‘Máscara de Proteína’. O íon Cu^{2+} é convertido a Cu^+ por pequenas moléculas e por proteínas. O ‘Máscara de Proteína’ previne a redução do Cu^{2+} pela proteína permitindo a análise de pequenas moléculas antioxidantes. O íon Cu^+ reduzido é quelado com uma sonda colorimétrica originando um pico que absorve a 570 nm. O valor da absorvância medida ao c.d.o. de 570 nm é proporcional à capacidade antioxidante total. As leituras foram realizadas num leitor de microplacas. A quantificação da capacidade antioxidante total do plasma, expressa em nmol equivalentes de Trolox (ETrolox). μL^{-1} de plasma, foi realizada substituindo o valor da leitura da absorvância na equação da reta padrão de Trolox.

LDL oxidada

A quantificação da lipoproteína de baixa densidade LDL oxidada (LDLox) presente no soro humano foi realizada por um método imunoenzimático ELISA com o *Kit* Mercodia Oxidized LDL ELISA da Mercodia (Lote 22553) (Mercodia, Uppsala, SE), de acordo com as instruções do fabricante. Este método ELISA é do tipo ‘sanduiche’ direto no qual dois anticorpos monoclonais são dirigidos contra determinantes antígenos separados na molécula apoproteína B oxidada. Durante a incubação, a LDLox presente no plasma reage com os anticorpos anti-LDLox imobilizados nos poços. Seguem-se lavagens para remoção de componentes do plasma não ligados, e a adição da anti-apoproteína B oxidada humana conjugado à peroxidase que reconhece a LDLox ligada na fase sólida. Após uma segunda incubação, foi realizada uma lavagem simples para eliminação do anticorpo conjugado não ligado. Os conjugados ligados foram detetados pela reação com o 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina (substrato). Esta reação foi então parada resultado da adição aos poços de uma solução de ácido sulfúrico 0,5 M que evidencia a cor desenvolvida durante aquela reação. Finalmente a densidade óptica dos poços foi medida num leitor de microplacas ao c.d.o. de 450 nm. A curva padrão foi elaborada pelo modelo de regressão spline cúbica. Os dados foram adquiridos e tratados no SoftMax® Pro 5.1. da Medical Devices LLC (Sunnyvale, CA, US).

Glicémia

A glicémia em jejum e pós-prandial foi avaliada no soro pelo método enzimático da hexoquinase GOD-PAP da Roche Diagnostics GmbH (*kit* nº de Série 04657527 190; Lote 674 529-01) (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, DE), no analisador automático Cobas Analyzer Roche® da Roche. Este método baseia-se na oxidação enzimática pela glucose oxidase com produção de H₂O₂. Os resultados obtidos, expressos em mg.dL⁻¹, foram calculados pelo analisador automático Cobas Analyzer Roche®.

Colesterol

A determinação do teor em colesterol total no soro foi realizada pelo método enzimático colorimétrico *in vitro* CHOL2 através de um *Kit* da Roche Diagnostics GmbH (nº de Série 04718917 190; Lote 681 689-01) (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, DE), no analisador automático Cobas Analyzer Roche® da Roche. O método envolveu as enzimas colesterol esterase, colesterol oxidase e peroxidase. Resumidamente, os esteres de colesterol da amostra foram hidrolisados por ação colesterol esterase em colesterol livre e ácidos gordos. O colesterol livre foi seguidamente oxidado a colest-4-en-3-ona e peróxido de hidrogénio, resultado da ação da enzima colesterol oxidase. Em presença da peroxidase, o peróxido de hidrogénio recém-formado promoveu a reação de oxidação/redução da 4-aminafenanzona com o fenol, obtendo-se o corante vermelho quinona-imina. A intensidade da cor vermelha, sendo diretamente proporcional à concentração em colesterol da amostra, foi medida no analisador automático Cobas ao c.d.o. de 512 nm. O teor em colesterol total de cada amostra, expresso em mgdL⁻¹, foi calculado automaticamente.

Colesterol LDL

A quantificação do colesterol LDL, das lipoproteínas de baixa densidade (LDL, do inglês ‘low density lipoproteins’) no soro foi realizada pelo método enzimático colorimétrico *in vitro* *Kit* LDL-Cholesterol da Roche Diagnostics GmbH (nº de Série - 05401682 190; Lote 674 564-01) (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, DE), no analisador automático Cobas Analyzer Roche® da Roche. Este método determinou diretamente o colesterol LDL da amostra resultado de uma solubilização micelar seletiva deste por ação de um detergente não iónico, e da interação de um composto contendo açúcares com as lipoproteínas de muito baixa densidade VLDL e quilomícrons. Na presença de M²⁺ um composto de açúcar promoveu uma inibição seletiva na reação da medição do

colesterol em VLDL e quilomícrons. A combinação do detergente aniônico com o composto de açúcar possibilitou uma solubilização seletiva do colesterol LDL que foi depois analisado por uma técnica similar à descrita para o colesterol total, por ação sucessiva das enzimas colesterol esterase, colesterol oxidase e peroxidase. A colesterol esterase hidrolisou o colesterol LDL a colesterol e ácidos gordos livres; na presença da enzima colesterol oxidase, o colesterol foi transformado em colesteno e peróxido de hidrogénio; a peroxidase catalisou a reação do peróxido de hidrogénio com um cromogénio para produzir um pigmento azul púrpura. A intensidade da cor azul púrpura medida no analisador automático Cobas ao c.d.o. de 585 nm era diretamente proporcional à concentração em colesterol LDL da amostra. O teor em colesterol LDL de cada amostra, expresso em mgdL^{-1} , foi calculado automaticamente.

Colesterol HDL

A determinação do conteúdo de colesterol HDL no soro humano foi realizada pelo método enzimático colorimétrico *in vitro* HDLC3 da Roche Diagnostics GmbH (*Kit* nº de Série - 05401488 190; Lote 674 239-01) (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, DE), no analisador automático Cobas Analyzer Roche® da Roche. Na presença de M^{2+} , o sulfato de dextrano formou de modo seletivo, complexos solúveis em água com o colesterol LDL, VLDL e quilomícrons. Estes complexos eram resistentes a enzimas conjugadas com o polietilenoglicol modificado. A concentração do colesterol HDL da amostra foi determinada enzimaticamente por ação sucessiva das enzimas colesterol esterase e colesterol oxidase conjugadas ao polietilenoglicol modificado e da peroxidase. A polietilenoglicol modificado-colesterol esterase hidrolisou o colesterol HDL a colesterol e ácidos gordos livres; na presença da enzima colesterol oxidase conjugada com o polietilenoglicol modificado, o colesterol foi transformado em Δ^4 -colestenona e peróxido de hidrogénio; finalmente, a peroxidase catalisou a reação do peróxido de hidrogénio com um cromogénio para produzir um pigmento azul púrpura. A intensidade da cor azul púrpura medida no analisador automático Cobas ao c.d.o. de 585 nm era diretamente proporcional à concentração em colesterol HDL da amostra. O teor em colesterol HDL de cada amostra, expresso em mgdL^{-1} , foi calculado automaticamente.

Triglicéridos

A quantificação de triglicéridos no soro humano foi realizada pelo método enzimático colorimétrico *in vitro* GPO-PAP da Roche Diagnostics GmbH (*kit* nº de Série – 04657594 190; Lote – 683 621-01) (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, DE), no analisador automático Cobas Analyzer Roche® da Roche. Brevemente, o método compreendeu a hidrólise completa dos triglicéridos da amostra a glicerol, usando uma lipoproteína lipase de origem microbiana, e a oxidação do glicerol a diidroxiacetona fosfato e H₂O₂, por ação de uma oxidase. O H₂O₂ produzido reagiu com 4-aminofenazona e 4-clorofenol na presença de peroxidase formando-se um composto de cor vermelha, o 4-(p-benzoquinona-monoimino)fenazona. A intensidade da cor vermelha medida no analisador automático Cobas ao c.d.o. de 500 nm era diretamente proporcional à concentração em triglicéridos da amostra. O método foi calibrado contra o método ID-MS com as soluções S1:0,9% NaCl e S2:C.f.a.s. (calibrador para sistemas automáticos) segundo as instruções do fornecedor. O teor em triglicéridos de cada amostra, expresso em mgdL⁻¹, foi calculado automaticamente.

As citocinas IL-1 β , IL-6 e TNF- α foram doseadas no plasma dos voluntários, em amostras colhidas em jejum e após o consumo do pequeno-almoço calórico ao longo de 6h, antes e após a intervenção nutricional na dieta dos participantes, por métodos imunoenzimáticos ELISA (do inglês ‘Enzyme-Linked Immunosorbent Assay’) através de *Kits* comerciais de alta sensibilidade. As técnicas ELISA usadas eram do tipo ‘sanduíche’ em duas fases, com captação de anticorpos plasmáticos da citocina em análise na fase sólida, seguida de adição do conjugado (ligado a uma enzima). Estes testes foram realizados em microplacas com 12 tiras de 8 poços cada. Os poços apresentavam-se revestidos com uma fase sólida e sensibilizados com um anticorpo específico para a citocina em análise.

IL-1 β

O doseamento da concentração da IL-1 β no plasma dos voluntários foi realizado por um método imunoenzimático ELISA de alta sensibilidade com o *Kit* Quantikine HS ELISA da R&D Systems (R&D Systems Europe, Ltd., Abingdon, UK), de acordo com as instruções do fabricante. O teste foi realizado numa microplaca de 96 poços, revestida com um anticorpo monoclonal de rato contra a IL-1 β humana. Os padrões e as amostras foram pipetados para os poços e a IL-1 β presente foi captada pelo anticorpo imobilizado à superfície do revestimento. Seguiu-se a adição do conjugado IL-1 β HS (anticorpo policlonal

específico para a IL-1 β humana conjugado com a fosfatase alcalina). A quantificação da IL-1 β envolveu as etapas seguintes: incubação dos padrões e das amostras pipetados para os poços e captação da IL-1 β presente pelo anticorpo imobilizado à superfície da fase sólida; lavagem para remoção de quaisquer substâncias não ligadas, adição do anticorpo policlonal específico ligado à fosfatase alcalina e incubação dos complexos insolubilizados com o antigénio combinado com a fosfatase alcalina; eliminação do conjugado livre por lavagem, seguida de revelação e de amplificação da atividade enzimática ligada à fase sólida, por adição do substrato (NADPH) e de enzimas (desenvolveu-se cor em proporção à quantidade de IL-1 β ligada na primeira etapa); paragem da reação com uma solução de ácido sulfúrico 2N; leitura das densidades ópticas a 490/650-690 nm. A subtração das leituras a 650-690 nm das leituras a 650 nm foi realizada para correção de imperfeições óticas na placa. A curva padrão foi elaborada pelo modelo de regressão não linear ajustada com quatro parâmetros logísticos (4-PL) com o padrão IL-1 β HS (pg.mL⁻¹), (IL-1 β recombinante humana numa base de proteína tamponada com conservantes). Os dados foram adquiridos e tratados no SoftMax[®] Pro 5.1. da Medical Devices LLC (Sunnyvale, CA, US).

IL-6

O doseamento da concentração da IL-6 no plasma dos voluntários foi realizado por um método imunoenzimático ELISA de alta sensibilidade com o *Kit* Quantikine HS ELISA da R&D Systems (R&D Systems Europe, Ltd., Abingdon, UK), de acordo com as instruções do fabricante. O teste foi realizado numa microplaca de 96 poços, revestida com um anticorpo monoclonal específico para IL-6 humana. A par das amostras foram igualmente analisados controlos positivos e negativos. O teste compreendeu a captação de anticorpos IL-6 humana do plasma na fase sólida, seguida de adição do conjugado IL-6 HS (anticorpo policlonal específico para a IL-6 humana conjugado com a fosfatase alcalina). A quantificação da IL-6 envolveu a realização das 5 etapas descritas no método anterior. A curva padrão foi elaborada pelo modelo de regressão não linear ajustada com quatro parâmetros logísticos (4-PL) com o padrão IL-6 HS (pg.mL⁻¹), (IL-6 recombinante humana numa base de proteína tamponada com conservantes). Os dados foram adquiridos e tratados no SoftMax[®] Pro 5.1. da Medical Devices LLC (Sunnyvale, CA, US).

TNF- α

A determinação da concentração da TNF- α no plasma dos participantes foi igualmente realizado por um método quantitativo imunoenzimático ELISA de alta sensibilidade com o *Kit* Quantikine HS ELISA da R&D Systems (R&D Systems Europe, Ltd., Abingdon, UK), de acordo com as instruções do fabricante. Neste teste a microplaca de 96 poços tinha sido pré-revestida com um anticorpo monoclonal específico para TNF- α humana. O teste compreendeu a captação de anticorpos TNF- α humana do plasma na fase sólida, seguida de adição do conjugado TNF- α HS (anticorpo policlonal específico para a TNF- α humana conjugado com a fosfatase alcalina). A quantificação da TNF- α seguiu igualmente as etapas descritas nos métodos anteriores. A curva padrão foi igualmente elaborada pelo modelo de regressão não linear ajustada com quatro parâmetros logísticos (4-PL) com o padrão TNF- α HS (pg.mL^{-1}), (TNF- α recombinante humana numa base de proteína tamponada com conservantes). Os dados foram adquiridos e tratados no SoftMax[®] Pro 5.1. da Medical Devices LLC (Sunnyvale, CA, US).

Fosfatase alcalina

A quantificação da atividade da fosfatase alcalina (ALP, do inglês ‘alkaline phosphatase’) no soro humano foi avaliada pelo método UV *in vitro* ALP IFCC 2^a geração da Roche Diagnostics GmbH (*kit* n° de Série – 04657373 190; Lote 681 641-01) (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, DE), no analisador automático Cobas Analyzer Roche[®] da Roche, segundo as instruções do fornecedor. Resumidamente, a fosfatase alcalina da amostra, em presença dos iões magnésio e zinco, hidrolisa o p-nitrofenil fosfato em fosfato e p-nitrofenol. O p-nitrofenol formado, medido pelo aumento da absorvância a 409 nm, é diretamente proporcional à atividade catalítica da fosfatase alcalina. A atividade catalítica da ALP, expressa em U/L, foi calculada automaticamente no aparelho.

Lactato desidrogenase (LDH)

A determinação quantitativa da atividade da enzima lactato desidrogenase (LDH) no soro humano foi avaliada pelo método UV *in vitro* LDH, de acordo com a 2^a versão do IFCC da Roche Diagnostics GmbH (*kit* n° de Série – 05401674 190; Lote 675 674-01) (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, DE), no analisador automático Cobas Analyzer Roche[®] da Roche, segundo as instruções do fornecedor. A LDH da amostra catalisa a conversão da L-lactato em piruvato e a redução da NAD⁺ em NADH. A taxa de redução da NADP, medida

pelo aumento da absorvância a 340 nm, é diretamente proporcional à atividade catalítica da LDH. A atividade catalítica da LDH, expressa em U/L, foi calculada automaticamente no aparelho.

α -Amilase

A avaliação quantitativa da atividade da α -amilase pancreática (AMYL) no soro humano foi avaliada pelo método colorimétrico *in vitro* AMYL, de acordo com o método da IFCC, da Roche Diagnostics GmbH (*kit* nº de Série – 05401704 190; Lote 680 584-01) (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, DE), no analisador automático Cobas Analyzer Roche® da Roche, segundo as instruções do fornecedor. Numa primeira fase a atividade da α -amilase salivar humana é inibida por dois anticorpos monoclonais distintos, sem afetar a atividade da α -amilase pancreática da amostra. Numa segunda etapa, a α -amilase da amostra promove a clivagem de olissacarídeos como o 4,6-etilideno-p-nitrofenil- α -D-malto-heptósido. Os produtos desta reação são posteriormente hidrolisados a p-nitrofenol e a glucose por ação da α -glucosidase. A taxa de formação do p-nitrofenol (cor amarela), medida pelo aumento da absorvância a 405 nm, é diretamente proporcional à atividade da α -amilase pancreática presente na amostra. A atividade da lipase, expressa em U/L, foi calculada automaticamente no aparelho.

Lipase C

A quantificação da atividade da lipase (LIP) no soro humano foi avaliada pelo método colorimétrico *in vitro* LIPC da Roche Diagnostics GmbH (*kit* nº de Série – 05401704 190; Lote 680 584-01) (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, DE), no analisador automático Cobas Analyzer Roche® da Roche, segundo as instruções do fornecedor. A lipase da amostra promove a clivagem de um substrato cromogênico 1-2-o-dilauril-rac-glicero-3-ácido glutárico(6-metilresorufina)-ester, em meio alcalino, originando o 1-2-o-dilauril-rac-glicerol e um intermediário instável, o ácido glutárico-(6-metilresorufina)ester. Em meio alcalino, este composto decompõe-se espontaneamente para formar ácido glutárico e metilresorufina. A taxa de formação da metilresorufina (cor vermelha), medida pelo aumento da absorvância a 583 nm, é diretamente proporcional à atividade lipase presente na amostra. A atividade da lipase, expressa em U/L, foi calculada automaticamente no aparelho.

As técnicas para doseamento de ALT, AST, ureia e creatinina já foram apresentadas no item 2.1.4.2 C) deste capítulo II.

3.1.5 Tratamento dos Resultados

Os testes estatísticos relativos ao tratamento dos resultados obtidos nos estudos de intervenção em humanos foram realizados no *software* SPSS Statistics 22,0 (IBM Inc., SPSS, Chicago, USA), considerando uma probabilidade de erro do tipo I (α) de 0,05. A distribuição normal das variáveis e a esfericidade da matriz de variâncias-covariâncias foram avaliadas, respetivamente, com os testes de Shapiro-Wilk e de Mauchly. A significância do efeito da suplementação ou não da dieta com framboesas sobre a variação pós-prandial de parâmetros bioquímicos ao longo de 6h, medidos em 2 a 5 momentos ($T_0=0h$; $T_1=1h$; $T_2=2h$; $T_3=4h$; $T_4=6h$), no mesmo grupo de indivíduos saudáveis, foi avaliada, quando verificados os pressupostos do método, com a ANOVA de medidas repetidas. Para o mesmo nº de observações, usou-se o modelo das somas quadráticas do tipo III; caso contrário, aplicou-se o modelo das somas quadráticas tipo IV. O valor *Greenhouse-Geisser* do Épsilon foi usado quando pressuposto de esfericidade não se verificou. Na identificação dos pares de médias que diferiram entre si, para a avaliação dos fatores e para a interação entre os mesmos, recorreu-se à comparação múltipla de médias com correção de *Bonferroni*. Quando os pressupostos do método não eram válidos aplicou-se a ANOVA de Ordens de Friedman seguido, sempre que aplicável, do teste de Wilcoxon para identificação dos pares com diferenças significativas em termos estatísticos. As diferenças entre tratamentos para as diferentes variáveis foram realizadas com o teste t-Student para amostras emparelhadas, considerando-se haver diferenças significativas para valores de $p < 0.05$.

3.2 Resultados e Discussão

Ao apresentar os resultados obtidos nestes estudos e, de modo a tornar a leitura mais fácil e evitar alguma confusão, iremos identificar o 1º ensaio como Ensaio Antes da Intervenção e o 2º ensaio como Após a Intervenção, sendo que a Intervenção consistiu no consumo diário de 150 g de framboesa pelos voluntários, durante 3 semanas. Relembramos a utilização da designação RRGa (refeição rica em açúcar e gordura) ao pequeno almoço fornecido aos voluntários nos 2 estudos.

3.2.1 Glicémia

Na Tabela II.6 são apresentados os resultados da avaliação da glicémia em jejum e em diferentes momentos após a ingestão de RRGa (1h e 2h), antes e após a intervenção nutricional com framboesas em indivíduos adultos saudáveis.

Analisando os resultados apresentados constata-se que a única diferença significativa verifica-se quando se comparam os valores basais da glicémia antes e após a ingestão das framboesas. Assim, o valor basal da glicémia aumenta mas não nos parece credível poder atribuir este efeito à ingestão crónica de framboesa, pois este fruto não contém grande quantidade de hidratos de carbono. Assim, e como a dieta dos voluntários não foi controlada e não lhes foi pedido que tivessem restrições alimentares durante o ensaio, com exceção dos 2 dias anteriores às colheitas de sangue, estes poderão, eventualmente, ter consumido uma dieta mais rica em hidratos de carbono na segunda parte do ensaio ou uns dias antes à colheita e, por isso, apresentarem valores mais elevados de glicémias em jejum. No entanto, as médias dos valores apresentados antes e após a intervenção nutricional não estão fora dos valores considerados normais que são até aos 110 mg/dL em jejum e até aos 140 mg/dL 2 h após refeição.

Tabela II.6 - Valores de Glicémia, avaliada em jejum e após o consumo de RRGa, antes e após a intervenção nutricional em voluntários adultos saudáveis

Tempos	Glicémia (mg/dL)	
	Antes da Intervenção	Após a Intervenção
0h	67,7 ± 10,60	77,2 ± 7,74 *
1h	60,7 ± 14,45	76,4 ± 38,53
2h	76,3 ± 35,40	81,7 ± 36,72

* $p < 0,05$ vs. o valor basal no mesmo ensaio (teste t-Student para amostras emparelhadas); Os resultados foram expressos como Média ± DP; n=12.

Pode concluir-se também que a RRGa não provocou alterações significativas nos valores de glicémia nos 2 ensaios, às 1h e 2h.

Os valores de glicémia às 1 e 2 h no 2º ensaio são superiores aos do 1º ensaio, pois o próprio valor basal já é superior, mas não são estatisticamente diferentes.

Resumindo, os resultados sugerem que nem o pequeno almoço nem a ingestão crónica de framboesa causaram alterações significativas nos valores de glicemia dos voluntários.

3.2.2 Triglicéridos

Na Tabela II.7 são apresentados os resultados dos triglicéridos séricos obtidos nos 2 ensaios.

No 1º ensaio (antes da intervenção), após a ingestão da RRGa os valores de triglicéridos aumentaram, como era previsível, atingindo o seu máximo às 6h. No entanto, os valores já eram estatisticamente mais elevados às 4h quando comparados com os valores basais. (Tabela II.7). Os triglicéridos tiveram, em média, um aumento total de mais de 100% relativamente à média dos valores basais.

Tabela II.7 - Valores de Triglicéridos, avaliados em jejum e após o consumo de RRGa, antes e após a intervenção nutricional em voluntários adultos saudáveis

Tempos	Triglicéridos (mg/dL)	
	Antes da Intervenção	Após a Intervenção
0h	83,1 ± 28,01	83,1 ± 24,98
1h	106,7 ± 47,40	115,3 ± 43,57
2h	132,3 ± 45,30	131,4 ± 48,34
4h	132,1 ± 40,17 *	138,8 ± 44,48 *
6h	146,9 ± 22,34 *	152,2 ± 46,93 *

* $p < 0,05$ vs. o valor basal no mesmo ensaio (teste t-Student para amostras emparelhadas); Os resultados foram expressos como Média ± DP; n=12.

Sabe-se que o aumento do valores de triglicéridos é normal acontecer após sobrecarga lipídica mas, o facto de todos os nossos voluntários apresentarem valores basais de triglicéridos normais (abaixo de 150 mg/dL), leva-nos a refletir que a hipertrigliceridemia pós-prandial pode ser um fator mais precoce que a hipertrigliceridemia em jejum e, como

tal, talvez devesse começar a ser utilizada como indicador de risco cardiovascular, em vez de serem somente levados em consideração os valores basais dos triglicéridos, aliás à semelhança do que já acontece com a utilização dos valores pós-prandiais de glicemia no despiste da diabetes.

Um estudo dinamarquês publicado em 2007 correlaciona os valores elevados de triglicéridos não basais com o risco de enfarto do miocárdio, doença isquêmica cardíaca e morte³⁴⁵.

Doentes com arterosclerose com ou sem síndrome metabólico, mesmo com valores normais de triglicéridos em jejum têm hiperlipidemia pós-prandial³⁴⁶ que pode ser também provocada por mecanismos inflamatórios^{268,347} e, por outro lado, o grande aumento pos-prandial dos triglicéridos tem como consequência o stresse oxidativo e a inflamação³⁴⁸. Assim, cria-se um ciclo vicioso que potencia ainda mais o aparecimento de outros fatores de risco, como a resistência à insulina, entre outros, todos eles potenciando o síndrome metabólico e o risco cardiovascular.

Nos resultados da Tabela II.7 podemos também observar um comportamento similar no 2º ensaio (Após a Intervenção) mas, na realidade, a ingestão das framboesas por tempo prolongado não provocou um decréscimo estatisticamente significativo, em nenhum dos valores de triglicéridos doseados no 2º ensaio quando comparados com os obtidos no 1º ensaio.

3.2.3 Colesterol, LDL e HDL

Como se pode verificar na Tabela II.8 os nossos resultados mostram que não houve variação dos valores de colesterol quer com a ingestão de RRGa quer com a ingestão crónica das framboesas durante o período do ensaio. Podemos constatar que todos os valores se encontram dentro dos valores considerados normais (< 200 mg/dL).

Tabela II.8 - Valores de Colesterol, LDL e HDL, avaliados em jejum e após o consumo de um pequeno-almoço hipercalórico, antes e após a intervenção nutricional em voluntários adultos saudáveis

PARÂMETRO Tempo	Antes da intervenção	Após a intervenção
Colesterol (mg/dL)		
0h	183 ± 27,3	187 ± 29,7
6h	166 ± 22,6	199 ± 20,6
Colesterol LDL (mg/dL)		
0h	106,9 ± 30,37	118,4 ± 15,87
6h	91,5 ± 17,45	105,8 ± 18,16 [#]
Colesterol HDL (mg/dL)		
0h	53,4 ± 19,3	53,7 ± 22,9
6h	45,2 ± 18,0 [*]	51,3 ± 21,6

[#] $p < 0,05$ vs o valor basal no mesmo ensaio e ^{*} $p < 0,05$ vs o valor no mesmo tempo no ensaio antes da intervenção (teste t-Student para amostras emparelhadas); Os resultados foram expressos como Média ± DP; n=12.

À semelhança do colesterol também os valores de LDL se encontram dentro dos valores normais, ou seja, até 130 mg/dL e não sofreram variações significativas em qualquer dos ensaios, embora o valor das 6h do 2º ensaio (após intervenção) seja estatisticamente superior ao obtido à mesma hora no ensaio antes da intervenção. No entanto, esta diferença parece poder ser explicada não pela ingestão das framboesas durante as 3 semanas mas, talvez, porque o valor do 1º ensaio seja muito baixo às 6h pois, como se pode verificar é mais baixo do que em jejum.

Na realidade temos de tomar em consideração que um “n” de 12, num ensaio deste tipo é manifestamente pequeno pois vão sempre existir variações individuais dos intervenientes no estudo, o que nos deixa na dúvida relativamente a alguns destes resultados, em especial, quando as diferenças não são muito relevantes. No entanto, 12 foi o “n” possível para fazer este estudo.

Em relação aos valores de colesterol HDL que estão igualmente representados na Tabela II.8, os resultados do 1º ensaio mostram uma diminuição significativa do valor de HDL ($p < 0,05$) provocado pela ingestão do pequeno almoço rico em gordura e açúcar. No entanto isso não acontece no 2º ensaio, após a ingestão diária de framboesas como se pode observar nos resultados após intervenção, o que consideramos ser um bom resultado.

Os níveis de colesterol não têm grandes variações só pelo facto de se ingerir uma refeição, seja ela calórica ou não, por isso os resultados obtidos no ensaio não são surpreendentes. Somente 1/3 do colesterol sérico é dependente da alimentação sendo que os outros 2/3 são sintetizados no fígado. Daí que nem sempre seja fácil baixar os níveis altos de colesterol no soro só com o controlo da alimentação.

O colesterol sérico elevado é considerado um dos fatores de risco das DCV mas, nos dias de hoje, já é assumido que só este parâmetro, por si só, não é suficiente para fazer uma avaliação do risco do desenvolvimento destas doenças. Assim, o seu valor deve ser correlacionado com os valores de LDL já que é esta lipoproteína que transporta o colesterol para as células e tecidos e também com os valores de HDL por ser a lipoproteína responsável pelo transporte do colesterol para o fígado onde será o processado para que seja excretado. Em resumo, níveis de colesterol e LDL elevados bem como níveis de HDL baixos, serão as condições que favorecem o fenómeno de aterosclerose e portanto o desenvolvimento de DCV.

Estudos epidemiológicos e de intervenção clinica têm demonstrado que os níveis plasmáticos de LDL estão diretamente correlacionados com o desenvolvimento de aterosclerose e DCV mas os resultados para a lipoproteína de alta densidade (HDL) ainda se consideram um pouco inconclusivos³⁴⁹. No entanto, existem resultados de vários estudos que evidenciam que a atividade do HDL se correlaciona inversamente com a doença coronária tendo efeitos diretos anti-aterogénicos e protetores vasculares. Enquanto a LDL leva o colesterol e triglicéridos para os macrófagos nas paredes das artérias, a HDL transporta as moléculas de gordura das paredes das artérias evitando a sua acumulação e, assim, previne a formação das placas ateroscleróticas e a consequente doença cardiovascular.

Para além do referido, a HDL pode diminuir a inflamação vascular por retirar lípidos, alguns deles oxidados, e diminuir a ativação de células imunes estimuladas por microrganismos e citocinas pró-inflamatórias, conduzindo a um estado anti-inflamatório, o que pode ser importante em situação de inflamação aguda mas também em doenças inflamatórias crónicas como artrite, doença renal, diabetes ou síndrome metabólico³⁵⁰.

A diminuição pós-prandial nos níveis de HDL, como o nosso estudo mostra, pode ocorrer em pessoas com dislipidemia pós-prandial e pode ser uma das explicações para que se deem fenómenos de aterogenicidade neste período.

Mas os nossos resultados sugerem que a ingestão continuada de framboesas poderá ter vantagens para os seus consumidores. A ingestão de framboesas não provocou o aumento dos valores plasmáticos de HDL, mas evitou o decréscimo pós-prandial observado no 1º ensaio e, conseqüentemente pode prever-se assim não haver diminuição de defesa relativa a alguns fatores de risco no desenvolvimento de aterosclerose, em especial numa situação de stresse oxidativo e inflamatório pós-prandial.

É reconhecida a importância da dieta no risco cardiovascular. A hipercolesterolemia é um dos fatores de risco no desenvolvimento das DCV e os valores de LDL, HDL e colesterol total têm sido relacionados com o risco cardiovascular^{351,352}.

Estudos epidemiológicos mostram claramente que o consumo de dietas ricas em frutos e vegetais relaciona-se negativamente com o risco das DCV³⁵³.

Este efeito protetor dos frutos e legumes tem sido atribuído, muitas vezes, aos seus altos conteúdos fenólicos pois dados de estudos epidemiológicos mostram uma associação entre o consumo diário de compostos fenólicos (via alimentação) e a diminuição do risco das DCV^{354,355}.

Outros estudos mostram aumentos de valores de HDL e diminuição de LDL em soros de sujeitos com dislipidemia quando a sua alimentação é suplementada com compostos fenólicos³⁵⁶.

Existem fortes evidências do efeito dos polifenóis, existentes nas bagas, nos lípidos do soro de populações com dislipidemia. Foram usados extratos ricos em antocianinas de arando e groselha preta, que foram dados a 120 voluntários, durante 12 semanas, provocando o aumento do nível de HDL sérico e decréscimo do LDL, mantendo-se inalterados os valores dos triglicéridos. No entanto, quando se aumentou o tempo de tratamento para 24 semanas as diferenças tornaram-se mais significativas^{357,358}.

Outro estudo realizado com morangos, dados durante 4 semanas a uma população com síndrome metabólico, fizeram diminuir os teores de LDL e triglicéridos³⁵⁹.

3.2.4 LDL oxidada

Na Tabela II.9 são apresentados os resultados das LDLox nos soros provenientes dos 2 ensaios.

Tabela II.9 - Valores de LDLox, avaliados em jejum e após o consumo de RRGa, antes e após a intervenção nutricional em voluntários adultos saudáveis

Tempos	LDLox (mg/dL)	
	Antes da Intervenção	Após a Intervenção
0h	44,6 ± 7,27	35,2 ± 5,35 [#]
4h	66,8 ± 12,72 [*]	47,9 ± 4,62 ^{*#}
6h	42,3 ± 8,81	33,7 ± 4,36 [#]

* $p < 0,05$ vs o valor basal no mesmo ensaio e [#] $p < 0,05$ vs o valor no mesmo tempo no ensaio antes da intervenção (teste t-Student para amostras emparelhadas); Os resultados foram expressos como Média ± DP; n=12.

A RRGa provocou a oxidação das LDL tanto no 1º como no 2º ensaio. Assim, tanto antes como após ingestão de framboesas verificou-se um aumento estatisticamente significativo da LDL oxidada 4h após o consumo da refeição hipercalórica, havendo, no entanto, uma regressão dos resultados às 6h, que voltam a igualar os basais. Podemos dizer que a ingestão de framboesas do ensaio de Junho não evitou a oxidação da LDL pela refeição mas o valor basal dos voluntários era estatisticamente menor depois da ingestão das framboesas bem como os valores às 4h e às 6h. Assim, os resultados sugerem um poder antioxidante grande das framboesas o que pode ser um dado muito importante num possível papel de prevenção do fenómeno de aterosclerose. Na realidade, para além dos valores de colesterol, LDL e HDL a oxidação das LDL é um factor de grande relevância na deposição do esteres de colesterol nas paredes arteriais e, conseqüentemente, na formação das estrias adiposas no interior dos vasos. As LDL oxidadas não são reconhecidas pelos recetores hepáticos e periféricos, sendo sim reconhecidas pelos monócitos diferenciados a macrófagos do espaço subendotelial do vaso sanguíneo. Os macrófagos infiltrados de LDL contendo ácidos gordos, colesterol e proteínas oxidadas (células espumosas) originam, numa primeira

etapa, a estria gorda e, depois, por estímulo da proliferação da musculatura lisa do vaso sanguíneo, o ateroma.

Podemos então concluir que qualquer composto ou alimento que evite a oxidação das LDL pode ter uma ação muito importante na prevenção da aterosclerose e, portanto, no desenvolvimento das DCV.

Assim, os nossos resultados sugerem um efeito benéfico do consumo das framboesas pois há decréscimo dos valores plasmáticos de LDLox, provavelmente obtido por mecanismos antioxidantes diretos pois são frutos ricos em polifenóis antioxidantes e também vitaminas. Embora a sua ação não consiga evitar completamente alguma oxidação das LDL, provocada pela refeição com muita gordura e açúcar, os valores de LDLox, após a ingestão das framboesas, são sempre significativamente menores e os próprios valores basais também.

3.2.5 Capacidade Antioxidante Total do Plasma

Os dados da atividade antioxidante total do plasma avaliados em jejum e em diferentes momentos após a ingestão de um pequeno-almoço rico em gordura e açúcar (1h, 2h, 4h e 6h), antes e após a intervenção nutricional com framboesas em indivíduos adultos saudáveis encontram-se reunidos na Tabela II.10.

Tabela II.10 - Capacidade antioxidante total do plasma (CAT), avaliada em jejum e após o consumo de um pequeno-almoço hipercalórico, antes e após a intervenção nutricional em voluntários adultos saudáveis

Tempos	CAT (ETrolox. μL^{-1})	
	Antes da Intervenção	Após a Intervenção
0h	0,438 \pm 0,353	0,280 \pm 0,207
1h	0,546 \pm 0,367	0,450 \pm 0,227
2h	0,813 \pm 0,497*	0,520 \pm 0,332
4h	0,492 \pm 0,475	0,310 \pm 0,056
6h	0,468 \pm 0,236	0,580 \pm 0,442

* $p < 0,05$ vs. o valor basal no mesmo ensaio (teste t-Student para amostras emparelhadas); Os resultados foram expressos como Média \pm DP; n=12.

Contrariamente ao que era esperado, os resultados apresentados na Tabela II.10, mostram uma tendência de aumento dos valores de CAT plasmática ao longo do tempo após o consumo da refeição, embora só o resultado obtido às 2h seja estatisticamente diferente do basal.

No ensaio realizado após o consumo das framboesas não se verificaram resultados diferentes estatisticamente mas podemos observar que a tendência é igualmente de haver aumento dos valores após o consumo da refeição.

Estes resultados não eram os esperados nem os referidos na literatura pois, entre vários outros fatores, como por exemplo o exercício físico intenso e o envelhecimento, também os alimentos altamente calóricos e ricos em gordura e açúcar estão intimamente associados ao stresse oxidativo por aumento de produção de radicais livres e, portanto, à diminuição de defesas antioxidantes e da CAT plasmática^{360,361}.

Quando comparamos os valores basais dos dois ensaios (antes e após o consumo das framboesas) também não se verificam diferenças estatisticamente significativas, embora neste caso se verifique uma tendência de diminuição dos valores após o consumo das framboesas, ou seja, novamente um resultado contrário ao esperado pois o consumo continuado de alimentos ricos em antioxidantes deveriam ter como consequência um aumento da capacidade antioxidante do soro, como confirmam alguns estudos^{362,363}, a não ser nos casos em que a ingestão seja de quantidades de tal modo exageradas que o efeito antioxidante se torne em efeito pró-oxidante.

No nosso estudo a ingestão diária de framboesa, fruto rico em antioxidantes pela sua composição não só em compostos fenólicos como também vitamina C, dava-nos a expectativa de que os valores da CAT plasmática dos voluntários seriam consideravelmente mais elevados logo no estado basal e, deste modo, as pessoas estariam melhor preparadas para combater o stresse oxidativo provocado pela refeição rica em gordura e açúcar e, consequentemente, mais protegidas quanto ao desenvolvimento de certo tipo de doenças já referidas anteriormente. Aliás, isto estaria de acordo com efeito antioxidante mostrado relativamente à oxidação das LDL.

Como já foi referido anteriormente (*item 2.1, Introdução*) existem vários métodos para determinar a capacidade antioxidante do plasma, métodos que vão quantificar capacidades antioxidantes e mecanismos de ação diferentes dos compostos que existem no plasma, mas também de alguns interferentes.

No nosso caso o *kit* usado na determinação utiliza o método colorimétrico que mede a contribuição antioxidante de proteínas e de pequenas moléculas antioxidantes.

Embora tenha sido reportado por vários autores que a framboesa é um fruto naturalmente rico em antioxidantes e com valores CAO elevados^{103,128,155,163}, sabe-se que só isto *per se* pode não ser suficiente para justificar benefícios para a saúde, até porque a quantidade de compostos associados à atividade antioxidante (compostos fenólicos e algumas vitaminas) vai determinar a efetividade dessa ação ou, por outro lado, se por existirem em quantidade exagerada poderão ter efeito contrário, ou seja, pró-oxidante.

A avaliação da CAO de fluidos biológicos com os testes anteriormente citados, ORAC, FRAP ou TEAC tem um significado biológico mais próximo da realidade fisiológica embora a temperatura não seja a do organismo, por exemplo. De qualquer modo e como se passa de um ensaio puramente químico, quando se fala desta determinação no fruto para uma determinação feita no soro, significa que se deu um passo enorme pois já estão contabilizadas a digestão, a biodisponibilidade dos compostos após digestão e até chegarem à circulação sanguínea. No entanto, teremos de contar com as possíveis interferências de outros compostos que existem em circulação e que podem de, algum modo, interferir com a ação dos compostos em estudo.

Mesmo tendo em consideração todos estes fatores, os resultados obtidos no nosso estudo não são os esperados e, poder-se-ia mesmo dizer, que são maioritariamente contraditórios. Seria suposto esperar que, após a ingestão de uma refeição rica em gordura e açúcares que irá induzir um stresse oxidativo pós-prandial, os valores da capacidade antioxidante do plasma deveriam diminuir. Pois não foi o que parece ter acontecido. Sendo assim, todo o pressuposto de atuação benéfica da alimentação suplementada com framboesas, que deveria fazer aumentar a própria capacidade antioxidante basal do plasma e, também, a reação de neutralização dos radicais livres que se originam pela ingestão da refeição calórica, cai um pouco por terra pois é difícil interpretar os resultados.

O ensaio deveria ser repetido para confirmar os resultados obtidos, poder-se-ia igualmente usar outras metodologias para a determinação e, seria muito importante, fazer outro tipo de determinações como outros marcadores do stresse oxidativo como por exemplo as enzimas antioxidantes superóxido dismutase (SOD), catalase, glutathione redutase (GSH), glutathione peroxidase (GPx) e outras, cujos resultados iriam contribuir para consolidar resultados e conclusões. Como não foi possível realizar estes ensaios por falta de tempo e também por constrangimentos económicos, pensamos ser um dos caminhos possíveis de seguir na continuação deste trabalho.

Num estudo em ratinhos alimentados com uma dieta aterogénica mas que tomaram ao mesmo tempo sumo de mirtilo durante 12 semanas, verificou-se um aumento da capacidade antioxidante do plasma com aumentos de SOD e GSH e, portanto, houve um aumento das defesas antioxidantes¹⁴³.

3.2.6 TNF- α , IL-1 e IL-6

As citocinas escolhidas para marcadores de inflamação no nosso estudo foram TNF- α , IL-1 e IL-6 que foram doseadas no soro de indivíduos adultos saudáveis, avaliados em jejum (0h) e às 2, 4 e 6h após a ingestão de um pequeno-almoço rico em gordura e açúcar, antes e após uma intervenção nutricional com framboesas durante 3 semanas, e os resultados obtidos podem ser consultados na Tabela II.11.

Podemos constatar que a RRGa induziu um aumento muito significativo (529%) dos valores de TNF- α às 4h no 1º ensaio mas que às 6h os valores voltaram a ser iguais aos basais. O mesmo se verificou no ensaio após o consumo de framboesas embora o aumento às 4h não fosse tão grande (469%). Podemos então considerar que as framboesas inibiram um aumento tão acentuado dos valores de TNF- α provocado pela refeição hipercalórica. Analisando os resultados da IL-1 pode-se verificar que nem a refeição nem a ingestão tiveram qualquer impacto nos valores desta citocina pró-inflamatória.

Os valores de IL-6 no 1º ensaio aumentam após a refeição, ao longo do tempo até às 6h de medição. 2 horas após a ingestão do RRGa os valores já são estatisticamente maiores que os observados em jejum e continuam aumentados às 4 e 6h.

Tabela II.11 - Teores das citocinas pró-inflamatórias IL-1 β , IL-6 e TNF- α , avaliada em jejum e após o consumo de um pequeno-almoço hipercalórico, antes e após a intervenção nutricional em voluntários adultos saudáveis

PARÂMETRO Tempo	Valor antes da intervenção	Valor após a intervenção
TNF-α (mg/mL)		
0h	1,7 \pm 0,60	1,3 \pm 0,37
2h	1,3 \pm 0,21	1,6 \pm 0,28
4h	9,0 \pm 0,75*	6,1 \pm 0,82*#
6h	1,5 \pm 0,32	2,1 \pm 0,37
IL-1β (mg/dL)		
0h	2,9 \pm 1,00	2,4 \pm 0,60
2h	2,5 \pm 1,18	2,6 \pm 0,68
4h	3,1 \pm 1,60	2,8 \pm 0,75
6h	2,6 \pm 1,03	2,4 \pm 0,75
IL-6 (pg/dL)		
0h	1,54 \pm 0,45	1,28 \pm 0,77
2h	2,57 \pm 1,21*	1,61 \pm 0,80 #
4h	3,06 \pm 0,57*	2,45 \pm 0,73*
6h	3,15 \pm 1,82*	1,88 \pm 0,90 #

* $p < 0,05$ vs. o valor basal no mesmo ensaio e # $p < 0,05$ vs. o valor no mesmo tempo no ensaio antes da intervenção (teste t-Student para amostras emparelhadas);¹Os resultados foram expressos como Média \pm DP; n=12.

Os nossos resultados estão concordantes com o estudo de Gregersen *et al.* em 2012, em que tanto uma refeição rica em gordura como outra rica em açúcar foram responsáveis pelo incremento dos valores pós-prandiais de IL-6³⁶⁴.

No 2º ensaio, após a ingestão das framboesas, a RRGa provocou um aumento de IL-6 mas só às 4h. Às 6h os seus valores já não são diferentes dos basais. Assim, comparando os valores obtidos nos 2 ensaios há diferenças estatísticas às 2 e às 6h o que sugere que a ingestão das framboesas parece induzir uma produção de IL-6 mas em menores quantidades mantendo-se assim mais elevadas durante um período de tempo mais curto.

Os nossos resultados são semelhantes aos encontrados em outros estudos que usaram igualmente alimentos ricos em compostos fenólicos.

Num estudo publicado por Zhu *et al.* em 2013 pode ver-se que uma mistura de antocianinas reduziu a resposta inflamatória em humanos hipercolesterolémicos, e diminuiu os níveis de LDL e aumentou os de HDL. No mesmo estudo, os autores demonstraram que antocianinas diferentes têm um efeito aditivo ou sinérgico na mediação das respostas anti-inflamatórias, em estudos feitos em culturas celulares³⁵⁸.

O soro de ratos tratados com mirtilo mostrou níveis mais baixos das citocinas pró-inflamatórias TNF- α e IL-6³⁶⁵.

Indivíduos com síndrome metabólico ingeriram 750 mg framboesa preta diariamente durante 12 semanas e outros um placebo. A framboesa causou uma diminuição dos valores basais de colesterol total e de algumas citocinas pró-inflamatórias, nomeadamente TNF- α e IL-6³⁶⁶.

3.2.7 Marcadores das funções hepática, pancreática e renal

Foram doseados marcadores de funções fisiológicas para avaliar a possível toxicidade das framboesas usadas no nosso ensaio. Todos os marcadores de possível toxicidade induzida pela ingestão de framboesa diariamente, durante um período de tempo prolongado não mostraram qualquer variação estatisticamente significativa, mantendo-se sempre dentro do intervalo de valores considerados fisiologicamente normais, como se pode verificar na Tabela II.12, o que nos confirma não ter havido qualquer situação de toxicidade nos nossos ensaios.

Tabela II.12 - Biomarcadores relativos à monitorização das funções hepática, pancreática e renal, antes e após a intervenção nutricional em voluntários adultos saudáveis¹

PARÂMETRO	Antes da intervenção	Após a intervenção
Alanina Aminotransferase (U/L)	13 \pm 6,8	18 \pm 10,8
Aspartato Aminotransferase (U/L)	20 \pm 6,1	21 \pm 5,3
Fosfatase Alcalina (U/L)	66 \pm 16,2	59 \pm 3,7
Lactato desidrogenase (U/L)	150 \pm 22,5	144 \pm 42,2
α -Amilase (U/L)	55 \pm 13,4	58 \pm 8,0
Lipase C (U/L)	22 \pm 6,0	20 \pm 9,1
Creatinina (mg/dL)	0,7 \pm 0,10	0,8 \pm 0,13
Ureia (mg/dL)	27,1 \pm 4,57	26,8 \pm 9,75

¹ Os resultados foram expressos como Média \pm DP; n=12.

Estes resultados eram esperados pois a framboesa é um fruto a que não está associada qualquer espécie de toxicidade e as doses ingeridas pelos voluntários foram quantidades perfeitamente normais e adequadas a uma alimentação racional.

Em resumo,

Está comprovado que dietas inadequadas podem ser pró-inflamatórias, aterogénicas e pro-trombóticas, favorecendo os fatores de risco para o desenvolvimento das DCV. Do mesmo modo existem evidências sobre os benefícios cardiovasculares e outros de alguns alimentos, nomeadamente dos frutos vermelhos ricos em polifenóis, embora o seu papel na prevenção dos fatores de risco associados a estas doenças nem sempre esteja muito claro.

Os estudos de intervenção dietética são ferramentas muito úteis pois fornecem informações sobre as manifestações fisiopatológicas e dão oportunidade de as gerir mas também de se poderem prevenir.

Estudos epidemiológicos têm mostrado a associação entre o alto conteúdo de flavonóides nos frutos vermelhos e um risco menor de DCV. Alguns estudos em animais e poucos estudos de intervenção em humanos têm lançado alguma luz sobre os efeitos benéficos de vários alimentos ricos em polifenóis nos marcadores de risco de DCV e efeitos anti-trombóticos, anti-inflamatórios, anti-dislipidémicos e anti-aterogénicos⁶.

No entanto, a maioria destes estudos têm sido feitos em grupos específicos de animais e humanos, ou seja, indivíduos com diabetes tipo 2, dislipidémicos, hipertensos e obesos. Poucos estudos são feitos com animais e humanos saudáveis no sentido de estudar prevenção. Com efeito, nestes indivíduos os estudos são mais difíceis pois os grupos em estudo terão de ser muito mais numerosos pois apresentarão, em princípio, os marcadores em estudo dentro dos valores normais e qualquer modificação, naturalmente, não será tão significativa e, por isso, mais difícil de demonstrar de uma forma estatisticamente significativa. Por outro lado os estudos envolvem vários grupos de compostos fenólicos e doses administradas muito diferentes.

Então muitos destes ensaios não são conclusivos como por exemplo o que foi desenvolvido por Ellis *et al.* em 2011 que estudou a possível atenuação de marcadores da

oxidação e da inflamação, que eram alterados pelo consumo de uma refeição rica em gordura e açúcar, durante 6 semanas, de uma bebida de morango ²⁶⁶.

Assim, parece-nos que será da maior importância desenvolver muitos mais ensaios em voluntários sãos para que se consigam comprovar os efeitos destes frutos ou de outros alimentos. Precisam ser estudados os efeitos, os compostos responsáveis por eles, as doses efetivas, a digestão e a biodisponibilidade desses compostos que será determinante para estabelecer a relação dose-efeito⁶.

Capítulo III.

ALEGAÇÕES DE SAÚDE SOBRE FRAMBOESAS (*Rubus idaeus* L.)

Capítulo III. ALEGAÇÕES DE SAÚDE SOBRE FRAMBOESAS (*RUBUS IDAEUS* L.)

Os frutos de *Rubus idaeus* L. nacionais caracterizados no capítulo I eram grandes, são, com boa qualidade físico-química (dados não apresentados), abundantes em compostos fenólicos e vitamina C. Os estudos apresentados no capítulo II sugerem que as framboesas analisadas podem apresentar propriedades funcionais. Os resultados obtidos no ENIH exploratório, embora careçam de confirmação, incentivam a prossecução de estudos na área da saúde cardiovascular. Neste âmbito, é importante clarificar neste trabalho quais são os requisitos exigíveis para o desenvolvimento de estudos capazes de contribuir para a fundamentação científica de uma alegação de saúde.

Assim, iremos apresentar e discutir os requisitos e orientações a seguir na fundamentação científica de alegações de saúde sobre alimentos na UE, visando contribuir para um alinhamento de estudos futuros com as exigências vigentes na UE nesta matéria. Considerando os estudos anteriores, daremos destaque a efeitos antioxidantes e anti-inflamatórios, tendo por referência a framboesa. Os aspetos respeitantes à saúde das articulações tendo por base suplementos alimentares podem ser consultados no trabalho de Bettencourt-Câmara *et al.*³⁶⁷. Por fim, serão apresentadas as alegações de saúde autorizadas que constam do Registo de Alegações Nutricionais e de Saúde sobre Alimentos da UE, suscetíveis de serem usadas em framboesas frescas.

1. METODOLOGIA

Este estudo compreendeu a realização de pesquisas nos sítios eletrónicos seguintes: Eur-Lex (<http://eur-lex.europa.eu/advanced-searchform.html> para a legislação vigente aplicável; EFSA (<http://www.efsa.europa.eu/en/nda/ndaguidelines.htm> e <http://www.efsa.europa.eu/en/nda/ndascdocs.htm>) consultado a 1 de Junho de 2015, para obtenção de orientações científicas e técnicas da EFSA e/ou de opiniões científicas relativas a pedidos de autorização de alegações de saúde; Direção-Geral de Alimentação e Veterinária, DGAV, <http://www.dgv.min-agricultura.pt>³, acedido no mês de Outubro de 2015, para identificação dos requisitos a considerar na submissão de pedidos de autorização em Portugal; Registo da UE de alegações nutricionais e de saúde (em inglês ‘EU Register of Nutrition and Health Claims’) (<http://ec.europa.eu/nuhclaims/>), acedido a 1 de Abril 2015,

³ <http://www.dgv.min-agricultura.pt/portal/page/portal/DGV/genericos?generico=5924898&cboui=5924898>

para pesquisa das alegações de saúde sobre alimentos autorizadas e não autorizadas pela Comissão Europeia. As pesquisas foram atualizadas a 10 de Novembro de 2015.

2. RESULTADOS E DISCUSSÃO

2.1 Alegações de Saúde sobre alimentos: elaboração do pedido de autorização e Fundamentação Científica

2.1.1 Elaboração do Pedido de autorização

Na UE, o uso de alegações de saúde (AS) realizadas em rótulos, na publicidade ou na promoção de alimentos, incluindo suplementos alimentares, carece da autorização prévia da Comissão Europeia e Estados-Membros, salvaguardando-se o cumprimento dos requisitos estabelecidos no Regulamento (UE) n° 1924/2006, atos modificativos e relacionados (Tabela III.1). O objetivo é garantir que as AS de alimentos comercializados na UE são justificáveis e cientificamente fundamentadas. Importa referir que as AS referem-se ao consumo de uma categoria de alimentos, de um alimento, ou dos seus constituintes, incluindo um nutriente ou outra substância (uma substância/constituente não-nutriente, com um efeito nutricional ou fisiológico²⁷⁶, p.ex. compostos fenólicos), ou uma combinação de nutrientes/outras substâncias, a seguir designados de ‘alimento’.

Um pedido de autorização de uma AS constitui um processo independente que reúne todas as informações e dados científicos apresentados visando a autorização da AS proposta³⁶⁸. Cada pedido deve referir-se à relação entre um alimento e um único efeito alegado³⁶⁸. De acordo com a legislação vigente, são considerados dados científicos pertinentes todos os estudos, realizados no ser humano ou não, publicados ou não publicados, considerados relevantes para fundamentar a AS objeto do pedido, quando avaliada a relação entre o alimento e o efeito alegado, incluindo os dados favoráveis a essa relação e os que não o forem³⁶⁸.

No nosso país, os pedidos de autorização, submetidos à DGAV devem satisfazer os requisitos da legislação vigente e de documentos orientadores relevantes aplicáveis à AS objeto do pedido (Tabela III.1). As etapas e os aspetos fundamentais a considerar na preparação de um pedido de autorização para uso de uma AS sobre alimentos apresentam-se na Tabela III.2.

Tabela III. 1 – Legislação e documentos orientadores relevantes no desenvolvimento de uma alegação de saúde sobre alimentos

LEGISLAÇÃO ¹	ORIENTAÇÕES ADMINISTRATIVAS ^{2,3}	ORIENTAÇÕES CIENTÍFICAS ²
Reg.1924/2006 relativo a alegações nutricionais e de saúde sobre alimentos (*) (Retificação JO L12, 18.1.2007, p.3)	EFSA/DNA. Draft General Scientific guidance for stakeholders on health claims applications** (EFSA Journal 20YY,volume (issue):NNNN; EFSA-Q-2015-00200).	EFSA/NDA Guidance on the scientific requirements for health claims related functions of the nervous system, including psychological functions. EFSA Journal 2012;10(7):2816 (EFSA-Q-2010-01185)
Reg.353/2008 que estabelece as normas relativas aos pedidos de autorização de alegações de saúde (*) (JO L109, 19.4.2008, p. 11)	EFSA/DNA. General Scientific guidance for stakeholders on health claims applications (1º revisão) (EFSA Journal 2011,9 (5):2170).	EFSA/NDA Guidance on the scientific requirements for health claims related to physical performance. (EFSA Journal 2012;10(7):2817; EFSA-Q-2010-01186)
Reg.1169/2011 que estabelece as normas relativas a prestação de informações ao consumidor sobre alimentos e altera o Reg. 353/2008. (*) (JO L 109, 19.4.2008, p. 11)	Parts 1 to 4 of the Application (Modelo inicial caracterizador do Pedido de Autorização) Appendix A – Application form (Modelo do Pedido de Autorização) Appendix B – General summary of the application (Descrição do Pedido de Autorização) Format for Applications, Appendices C-I (Tabelas Anexas ao Pedido de Autorização)	EFSA/NDA Guidance on the scientific requirements for health claims related to bone, joints, skin and oral health. EFSA Journal 2012;10(5):2702; EFSA-Q-2010-01182)
Decisão 2013/63 que adota orientações científicas e técnicas da EFSA para a preparação e submissão de pedidos de autorização de alegações de saúde (EFSA Journal 2011,9(5):2170).	EFSA General guidance for stakeholders on the evaluation of Article 13.1, 13.5 and 14 health claims (EFSA Journal 2011;9(4):2135; EFSA-Q-2011-00216)	EFSA/NDA Guidance on the scientific requirements for health claims related to appetite ratings, weight management and blood glucose concentrations. EFSA Journal 2012;10 (3):2604; EFSA-Q-2010-01183)
Reg.433/2012 que estabelece uma lista de alegações de saúde permitidas relativas a alimentos que não referem a redução de um risco de doença ou o desenvolvimento da saúde das crianças (*) (JO L 136, 25.5.2012, p. 1)	Guia geral para a implementação do Reg 1924/2006 aprovado pelo Comité Permanente da Cadeia Alimentar e da Saúde Animal em Dezembro 14, 2007	EFSA/NDA Guidance on the scientific requirements for health claims related to antioxidants, oxidative damage and cardiovascular health. EFSA Journal 2011;9(12):2474 (EFSA-Q-2010-01182)
Registo da UE de alegações nutricionais e de saúde sobre alimentos ⁴	Alegações Nutricionais e de Saúde. Guia de Utilização ³ (17out.2011) (Requisitos, normas de utilização e outra informação)	EFSA/NDA Guidance on the scientific requirements for health claims related to gut and immune function EFSA Journal 2011;9(4):1984 (EFSA-Q-2010-01139) EFSA/NDA Guidance on the Scientific requirements for health claims related to the gastro-intestinal tract, the immune system, and defence against pathogenic microorganisms. EFSA Journal 2011;9(12):2474

¹Disponível em www.euro-lex.europa.eu ; ²disponível em <http://www.efsa.europa.eu/en/ndaclaims/ndaguidelines.htm>; e em www.dgv.min-agricultura.pt; ³<http://ec.europa.eu/nuhclaims/> (*) e atos modificativos; ** deverá ser adotada a partir de 10/12/2015 e substituir a versão de 2011.

Tabela III.2 – Etapas e aspetos fundamentais a considerar na preparação de um pedido de autorização para uso de uma alegação de saúde sobre alimentos na UE

ETAPAS	ASPETOS A CONSIDERAR
I. Definição do tipo de alegação de saúde (AS)	AS relativa a: i) uma função bem estabelecida de um nutriente essencial ii) a funções de nutrientes essenciais não estabelecidas; iii) outras substâncias Pesquisa e análise de potenciais AS, aprovadas ou rejeitadas, similares à AS-alvo no Registo da UE de AS.
II. Caracterização do alimento/constituente	i) Nutriente essencial - caracterização da fórmula química presente no alimento ou adicionada ao alimento ii) Outra substância - caracterização da composição e características e do processo de fabrico.
III. Formulação do efeito alegado	Revisão exploratória de estudos em humanos ¹ visando a identificação do: i) Impacto na saúde/doença, resultados das variáveis e dos métodos de medição; ii) Efeito fisiológico benéfico.
IV. Identificação dos estudos em humanos pertinentes para a fundamentação da AS	Revisão compreensiva dos estudos em humanos. Separação dos estudos com grupos-alvo não adequados (podem ser considerados como evidência de suporte) dos com grupos-alvo apropriados.
V. Avaliação da qualidade individual dos estudos em humanos	Em relação ao(s): i) resultados das variáveis e dos métodos de medição; ii) risco de viés. Exclusão dos estudos de baixa qualidade. Identificação dos estudos em humanos pertinentes.
VI. Desenvolvimento de uma base para a plausibilidade biológica da AS	Identificação de evidências de suporte (estudos em humanos, em animais e <i>in vitro</i>)
VII. Revisão da evidência disponível	Separação das evidências apropriadas/suficientes para a fundamentação científica das inadequadas/insuficientes, identificando as suas limitações.
VIII. Definição das condições de uso da AS	Estudos individuais em humanos Meta-análises (se disponíveis)
IX. Preenchimento e submissão da candidatura	Consultar as orientações da EFSA para a preparação e apresentação de um pedido de autorização para uma AS (ver Tabela III.1).

(adaptado de EFSA/NDA³⁶⁹)

2.1.2 Fundamentação científica

Os critérios e as etapas fundamentais de avaliação do suporte científico dos pedidos de AS sobre alimentos estão reunidos na Tabela III.3.

Tabela III.3 – Fundamentação científica das alegações de saúde sobre alimentos. Critérios e processo de avaliação do suporte científico dos pedidos de autorização de alegações de saúde.

1. O alimento para o qual o efeito alegado é atribuído deve estar caracterizado.
2. A fundamentação científica deve ser baseada em dados de estudos realizados em humanos, sobretudo de estudos de intervenção. O desenho destes estudos deve incluir os aspetos seguintes:
 - (i) Grupos-estudo¹ adequados representativos da população-alvo (p.ex da população saudável em geral ou subgrupos desta);
 - (ii) Controlos adequados;
 - (iii) Exposição com duração adequada e *follow up* capaz de demonstrar o efeito alegado;
 - (iv) Caracterização dos hábitos alimentares e de aspetos do estilo de vida dos elementos do grupo-estudo;
 - (v) A dose, ié, a quantidade de alimento/constituente a ingerir para se obter o efeito alegado. Esta deve ser consistente com um padrão de consumo compatível com uma alimentação variada
 - (vi) O efeito da matriz alimentar e do contexto alimentar no efeito funcional do componente;
 - (vii) A monitorização da ingestão do alimento sobre o qual é realizada a alegação (biodisponibilidade);
 - (viii) A potência estatística dos testes de hipóteses usados.
3. Quando o *endpoint* do efeito alegado não pode ser medido diretamente os estudos devem usar marcadores.
4. Os marcadores devem ser:
 - (i) biologicamente válidos, ié, têm uma relação conhecida com o resultado final e sua variabilidade dentro da população-alvo é conhecida
 - (ii) metodologicamente válidos, ié, as características analíticas estão validadas.
5. No estudo, a variação da variável-alvo deve ser estatisticamente significativa e esta variação deve biologicamente significativa, de modo consistente, para o grupo-alvo. Esta é uma condição essencial para a fundamentação científica da alegação de saúde.
6. A alegação deve ser suportada cientificamente tendo em conta a totalidade dos dados disponíveis e considerando as evidências.

(Adaptado de Aggett et al.³⁷⁰; Richardson³⁷¹; EFSA/NDA³⁶⁹)

¹Um grupo-estudo é considerado representativo da população-alvo quando os sujeitos-estudo foram selecionados de modo aleatório da população-alvo. Um grupo-estudo é considerado adequado quando a extrapolação dos resultados para a população-alvo é biologicamente plausível.

A grande maioria das AS propostas desde 2008 têm sido consideradas não fundamentadas. A 10 de Novembro de 2015, das 2283 AS do Registo de UE, apenas 11% estão autorizadas.

Na avaliação da relação específica de um alimento com a saúde o Painel NDA considera as seguintes questões³⁶⁹: (i) o alimento/constituente está definido e caracterizado? (ii) o efeito alegado é definido e é um efeito fisiológico benéfico para a população-alvo e pode ser medido *in vivo* em humanos? (iii) a relação de causa/efeito entre o consumo do alimento/constituente e o efeito alegado está estabelecida, para o grupo-alvo e sob as condições de uso proposta?

O uso de AS só pode ser permitido se o alimento para o qual a AS é realizada demonstrou ter um efeito fisiológico benéfico, considerada a informação disponibilizada e a população-alvo. Nas AS funcionais, este efeito com a manutenção, perda reduzida ou melhoramento de uma função do corpo. Em AS deste tipo relativas a outras substâncias, p.ex. compostos fenólicos, os efeitos alegados devem referir-se a uma função específica do corpo. Neste caso, AS relativas a funções inespecíficas de órgãos, tecidos ou sistemas (p.ex. função imune) são consideradas insuficientes. Alterações no resultado de variáveis medidas *in vivo* em humanos, por metodologias bem estabelecidas, não podem constituir a única base para a fundamentação científica da AS.

Se a relação de causa/efeito entre o consumo do alimento/constituente e o efeito alegado está estabelecida, o Painel NDA considera os restantes aspetos, nomeadamente a quantidade de alimento e o padrão de consumo necessários à obtenção do efeito alegado no âmbito de uma dieta equilibrada e variada.

As principais razões referidas pelo Painel NDA da EFSA nos julgamentos científicos respeitantes às diferentes avaliações de suportes científicos de pedidos de AS apresentam-se na Tabela III.4.

Tabela III.4 – Argumentos científicos da EFSA respeitantes a pedidos de AS não fundamentados.

A caracterização do alimento/constituente era insuficiente,
Informação insuficiente relativa a efeitos da matriz, processamento, estabilidade, biodisponibilidade, variação do teor alimento/constituente,
A relação causa-efeito entre o alimento/constituente e o efeito alegado não foi comprovada,
Ausência de revisão sistemática da literatura e/ou de critérios de inclusão e de exclusão,
Insuficiências no desenho dos estudos e na descrição/caracterização do grupo-alvo, da dieta e do estilo de vida dos participantes; ausência de cálculos de potência, efeitos não mensuráveis;
Ensaio clínico, com grupos-alvos doentes, usados como evidências para efeitos de saúde relativos à população em geral (sã).

Embora as disposições do Regulamento (UE) n° 1924/2006 não se apliquem a alegações feitas em comunicações não comerciais (p.ex. orientações ou conselhos dietéticos e publicações científicas) (considerando 4)²⁷⁶, a fundamentação científica de AS alicerça-se

em estudos realizados em humanos, e em estudos *in vivo* e *in vitro* em modelos experimentais^{368,369}. Ainda que a relação entre o consumo do alimento e o efeito fisiológico benéfico alegado deva incluir evidências de diferentes tipos, os estudos de intervenção em humanos aleatórios, controlados (RCT do inglês *randomized controlled trials*) pertinentes constituem as provas científicas com maior peso³⁶⁸. Estudos de intervenção em humanos aleatórios (não controlados), controlados (não aleatórios) e outros são essenciais na fundamentação científica de AS na UE. No entanto, os estudos RCT nem sempre se adequam à avaliação de efeitos nutricionais de alimentos, sobretudo de alimentos não processados, de p.ex. framboesa ou compostos fenólicos destes pequenos frutos, pois o seu custo é muito elevado, as matrizes são muito complexas, as interações podem ser consideráveis e o controlo experimental é desafiante.

A identificação e validação de biomarcadores relevantes, nomeadamente para AS relativas à redução de um risco de doença, é um requisito essencial à fundamentação científica de AS³⁶⁹. A satisfação dos critérios considerados pela EFSA (ponto 4 (i) e (ii), Tabela III.3) em estudos de intervenção em humanos com voluntários são pode ser desafiante ou impraticável. O desenvolvimento de biomarcadores, a sua validação e qualificação exige mais investigação visando o estabelecimento de normas e orientações consensuais³⁷¹.

2.2 Requisitos científicos para alegações de saúde relativas a efeitos antioxidantes e anti-inflamatórios

Para além dos requisitos genéricos apresentados anteriormente, na avaliação da fundamentação científica de AS relativas a efeitos antioxidantes e anti-inflamatórios o Painel em Produtos Dietéticos, Nutrição e Alergias (NDA) da EFSA considera as orientações específicas indicadas na Tabela III.1.

A manutenção de uma função imune normal é considerada um efeito fisiológico benéfico quando indicado o aspeto específico da função imune que constitua o objetivo da alegação submetida²⁷⁹. A estimulação de um marcador do sistema imunológico (os n.ºs de várias subpopulações linfóides em circulação, respostas proliferativas de linfócitos, actividade fagocitária de fagócitos, actividade lítica de células natural *killer* e citolítica de células T, a produção de mediadores celulares, os níveis de imunoglobulina secretadas e no soro, entre

outros) é uma condição necessária mas não estabelece um efeito fisiológico benéfico. Esses resultados devem ser acompanhados de benefícios fisiológicos ou clínicos obtidos, de preferência, nos mesmos estudos de intervenção. Na fundamentação de alegações sobre a manutenção da função imune normal em grupos populacionais considerados em risco de imunossupressão (idosos, indivíduos em situação de stresse ou praticando exercício físico intenso ou após uma exposição a radiações UV), podem ser considerados adequados estudos sobre sujeitos imunossuprimidos (confirmados por marcadores imunes e/ou sintomas), com dados que evidenciem a melhoria de sintomas e/ou dos marcadores imunológicos. Pelo contrário, na fundamentação de AS do Artigo 13.5 relativa à redução da inflamação, a apresentação de dados relativos a alterações de marcadores de inflamação é considerada insuficiente, p. ex. as várias interleucinas, pois não indica um efeito fisiológico *per se*. Neste caso, essas provas devem ser acompanhadas de um benefício fisiológico ou de um resultado clínico. No âmbito de uma AS relativa à redução de um risco de doença relacionada com processos de inflamação crónica, dados de alterações dos níveis de marcadores de inflamação podem indicar um efeito fisiológico benéfico no contexto da redução de um risco de doença se, para (um)a intervenção dietética específica, for evidente que a alteração dos níveis dos marcadores de inflamação é acompanhada pela redução da incidência da doença considerada.

Presentemente, a EFSA não considera que a capacidade, conteúdo ou propriedades antioxidantes de alimentos ou constituinte(s) ou baseadas na capacidade de resgate de ROS *in vitro*, medidas em sistemas modelo, exerça(m) um efeito fisiológico benéfico em humanos³⁷². Também não são consideradas válidas, por enquanto, alegações sobre o estado ou a defesa antioxidante ou as relativas ao sistema de defesa antioxidante, exceto para vitaminas e minerais essenciais com um papel na rede antioxidante humana comprovado³⁷². As primeiras são, regra geral, alegações fundamentadas em alterações da capacidade antioxidante total do plasma que, incluindo estudos em humanos *in vivo* avaliam alterações da capacidade antioxidante do plasma recorrendo a ensaios TRAP, TEAC, ORAC ou à oxidação de iões ferrosos segundo o método do laranja-xilenol, FOX. As segundas apresentam provas inespecíficas, que indicam uma resposta biológica ao stresse de qualquer origem, incluindo da dieta, p. ex. a indução de enzimas antioxidantes como a catalase, a SOD, a GPx ou a limitação do decréscimo da glutathione.

2.3 Alegações de Saúde suscetíveis de serem usadas por frutos de *Rubus idaeus* L.

As framboesas frescas podem, de acordo com a sua composição centesimal e para o consumo de uma dose mínima de 100g, usar AS funcionais genéricas estabelecidas no Regulamento (UE) nº 432/2012³⁷³ para os seguintes nutrientes: vitamina C, folatos e manganês (Tabelas 3 e 4, Apêndice C).

De entre AS permitidas salientam-se: ‘a vitamina C contribui para o normal funcionamento do sistema imunitário’, ‘o manganês contribui para a proteção das células contra o stresse oxidativo’ e ‘os folatos contribuem para o normal funcionamento do sistema imunitário’. Assim, p.ex. estudos visando a avaliação do efeito de compostos fenólicos da framboesa na manutenção do sistema imunológico é importante ter em consideração o contributo relativo da vitamina C e de folatos.

Em resumo:

- (i) O desenvolvimento de alegações de saúde na UE é um processo complexo que carece de autorização prévia. Em Portugal a DGAV é a entidade competente que recebe e realiza a avaliação prévia dos pedidos de autorização das alegações propostas;
- (ii) A avaliação da comprovação da relação alimento/constituente-alvo e efeito fisiológico benéfico alegado o painel NDA da EFSA analisa as todas as provas disponíveis no suporte científico que integra os pedidos de autorização de alegações de saúde. Embora sejam admissíveis evidências de diversos tipos, nesta avaliação a EFSA considera a hierarquia das provas científicas tal como está definida na legislação e orientações científicas e técnicas;
- (iii) A fundamentação científica das alegações baseia-se em estudos realizados em humanos. Dados de estudos de intervenção nutricional em humanos aleatórios e controlados constituem as evidências científicas mais fortes. No entanto, para além do custo elevado, em termos experimentais, a realização destes estudos é desafiante ou inviável;

- (iv) Ainda que as alegações de saúde possam ser realizadas sobre alimentos, p.ex. frutos frescos de *Rubus idaeus* L., os pedidos de autorização submetidos têm sido rejeitados. Na prática, abordagem que prevalece está focada na avaliação do impacto de constituintes de alimentos, nutrientes e não nutrientes, como p.ex. compostos fenólicos. Em nutrição esta abordagem é questionável;
- (v) A ausência de biomarcadores adequados, nomeadamente para alegações relativas à redução de um risco de doenças, constitui um constrangimento na fundamentação científica destas alegações.

Capítulo IV.

CONCLUSÕES E CONSIDERAÇÕES FINAIS

CAPÍTULO IV. CONCLUSÕES E CONSIDERAÇÕES FINAIS

Este trabalho foi delineado e desenvolvido visando satisfazer os objetivos relativos à caracterização química e a avaliação da atividade biológica da framboesa vermelha (*Rubus idaeus* L.) propostos inicialmente. No final de cada um dos três capítulos anteriores apresentámos de forma resumida as conclusões dos mesmos. Neste capítulo final apresentamos as conclusões relevantes tendo em conta todos os estudos realizados, embora as abordagens acima citadas sejam consideradas em separado.

Caracterização Química (objetivos específicos I e II, *item 5* da Introdução)

Da caracterização química das amostras estudadas os aspetos mais relevantes foram os seguintes:

- As metodologias usadas na caracterização fenólica dos extratos de frutos de *Rubus idaeus* L. das cultivares em estudo mostraram-se adequadas para o fim visado. O conjunto de ensaios usados permitiu obter informação importante sobre a composição química das várias amostras.
- A metodologia de espetrometria de massa MALDI-TOF possibilitou a identificação rápida de vários espetros e a identificação dos (poli)fenóis descritos na bibliografia, antocianinas, elagitaninos, ácido elágico e derivados e derivados da quercetina, e de compostos fenólicos que, a confirmarem-se, foram identificados pela primeira vez nesta matriz, nomeadamente antocianinas derivadas da delfinidina, peonidina e petunidina, um flavonol derivado da isoramnetina, ácido quínico e um derivado deste e do ácido cafeíco.
- Os resultados obtidos na análise dos extratos de framboesa por MALDI-TOF evidenciam a complexidade desta matriz e a necessidade de efetuar mais trabalho, variando condições experimentais com o objetivo de identificar um maior número de compostos, fenólicos e não fenólicos. O número diminuto de bases de dados correspondentes a este tipo de análise torna a identificação dos compostos uma actividade morosa mas desafiante.

- A caracterização química do extrato por HPLC-DAD e HPLC-ESI-MS/MS mostrou que as amostras estudadas apresentam diversos compostos fenólicos, sobretudo antocianinas derivadas da cianidina e da pelargonidina.
- A aplicação dos ensaios espectrofotométricos (teores totais de fenóis, flavonóides, antocianinas, taninos hidrolisáveis e condensados) aos dois tipos de extratos ensaiados confirmou que a melhor metodologia de extração de compostos fenólicos nas amostras de framboesa foi a obtida com a solução extratante metanol:água:ác.fórmico (79,9:20:0,1 v/v/v).
- Do conjunto de amostras estudadas conclui-se que ao longo de um tempo de colheita normalmente considerado para estes frutos no Outono, os frutos das quatro cultivares (Himbo-top, Amira, Erika e Polka) eram abundantes em compostos fenólicos mas apresentavam algumas diferenças em termos de evolução dos parâmetros químicos, nomeadamente no que se refere fenóis e flavonóides totais.
- Das cultivares estudadas a Amira apresentou teores elevados em fenóis totais e em taninos hidrolisáveis totais, apresentando teores em flavonóides totais e em antocianinas totais avaliadas por HPLC-DAD elevadas pelo que foi escolhida para o estudo nutricional de intervenção em humanos;
- No estudo da caracterização das amostras das variedades de *Rubus idaeus* L. com expressão em território nacional, ao longo de um ciclo produtivo e de três anos consecutivos não se verificaram alterações significativas na sua composição fenólica em termos quantitativos mas observaram-se diferenças nos compostos individuais.

Avaliação da Atividade Biológica (objetivos específicos III e IV, *item 5* da Introdução)

Nos ensaios em modelos experimentais *in vitro* e *in vivo* os efeitos principais foram os seguintes:

- O extrato de *Rubus idaeus* L. mostrou atividade antioxidante elevada em testes *in vitro*, não só de avaliação de atividade antioxidante química, testes ORAC e HORAC,

mas igualmente em ensaios que avaliam o mesmo efeito em meio celular, tais como o CAC realizado em células Caco-2, e na modulação do *oxidative burst* dos neutrófilos.

- O extrato em estudo quando administrado p.o. não inibiu a inflamação aguda da pata de ratos induzida pela carragenina mas, o mesmo extrato administrado i.p., teve efeito anti-inflamatório neste modelo animal de inflamação aguda, superior ao alcançado pela indometacina e trolox.
- O mesmo extrato, administrado oralmente ou i.p., mostrou uma potente atividade anti-inflamatória num modelo animal de inflamação crónica, AR induzida pelo colagénio, com diminuição de edema, dos danos na cartilagem, de pannus e reabsorção óssea e com diminuição na expressão de iNOS e COX2, demonstrando assim, uma proteção significativa na progressão da AR.

No estudo de intervenção nutricional em humanos, com voluntários saudáveis que ingeriram framboesa durante 3 semanas e a quem foi dada uma refeição rica em gordura e açúcar com o objetivo de desencadear stresse metabólico, oxidativo e inflamatório, os efeitos principais foram os seguintes:

- A ingestão de framboesa durante 3 semanas não alterou os valores de HDL obtidos em jejum, mas evitou o decréscimo pronunciado dos níveis de HDL provocado pela RRGa no ensaio anterior (sem ingestão do fruto). Este efeito pode, eventualmente, ter como consequência a uma diminuição de fenómenos ateroscleróticos e inflamação vascular, favorecidos por valores baixos de HDL.
- A ingestão crónica de framboesas não conseguiu evitar a oxidação das LDL pela refeição calórica mas os valores obtidos foram significativamente menores que os obtidos no 1º ensaio e o próprio valor basal dos voluntários foi significativamente menor do que apresentavam anteriormente (1º ensaio).
- Relativamente aos marcadores de inflamação estudados, a ingestão crónica de framboesa atenuou o aumento dos valores de TNF- α às 4h, provocado pela refeição

hipercalórica, e diminuiu de forma significativa o aumento dos valores de IL-6 provocado pela mesma refeição.

- Assim, podemos dizer que o nosso estudo demonstrou efeitos antioxidantes e anti-inflamatórios (agudos e crónicos) do extrato fenólico de framboesa e do próprio fruto, em ensaios *in vitro* e *in vivo*, em modelos animais e em ensaios em humanos, o que nos sugere que este fruto pode apresentar características importantes e promissoras na manutenção da saúde humana, especialmente, no que respeita a algumas doenças crónicas.

Contributo para o desenvolvimento de uma alegação de saúde (objetivo geral, *item 5* da Introdução)

A comercialização de alimentos e suplementos alimentares com alegações de saúde carece de autorização prévia. Do trabalho realizado no âmbito das alegações de saúde constatámos o seguinte:

- Os requisitos legais e constantes de orientações da EFSA a considerar no desenvolvimento de alegações de saúde sobre alimentos ou suplementos alimentares na UE são muito exigentes e o seu cumprimento exige um investimento considerável.
- O desenvolvimento de uma alegação de saúde para frutos frescos ou extratos de *Rubus idaeus* L. exige, entre outros aspetos, a identificação, caracterização e comprovação prévia do(s) constituinte(s) responsáveis pelo efeito alegado.

Considerações para trabalho futuro

A disponibilização no mercado de um suplemento alimentar à base de frutos de *Rubus idaeus* L. com uma alegação de saúde relativa à manutenção da saúde das articulações autorizada poderia contribuir para a valorização da framboesa e iria certamente beneficiar a população em geral, sobretudo mulheres. No entanto, a progressão de trabalho científico exigirá o desenvolvimento dos diversos estudos, nomeadamente:

- Desenvolvimento de um extrato rico em compostos fenólicos, extraídos da matriz por tecnologias limpas (p.ex. extração com dióxido de carbono em condições supercríticas);
- Repetições dos ensaios nos modelos de inflamação, em ratos com padrões puros, isolados ou em mistura, ou com misturas de compostos da framboesa com potencial atividade anti-inflamatória (no caso de compostos, como elagitaninos, para os quais não estão disponíveis padrões comerciais);
- Realização de estudos de digestão do extrato, *in vitro*, e identificação dos metabolitos resultantes deste processo;
- Realização de estudos em humanos para avaliação da biodisponibilidade dos constituintes em estudo, nomeadamente antocianinas e elagitaninos, e identificação dos metabolitos resultantes deste processo. Este estudo e o anterior são fundamentais para o estabelecimento da relação efeito-dose;
- A aplicação da espetrometria de massa MALDI-TOF em associação com metodologias de tratamento de um elevado número de dados pode ser uma metodologia útil numa identificação preliminar dos compostos fenólicos das matrizes em estudo. Para a quantificação, as amostras deverão ser analisadas por LC-MS/MS. Na perspetiva de trabalho futuro será de apostar na tentativa de identificação de mais compostos utilizando esta metodologia.
- Realização de ensaios de intervenção em voluntários sãos, com um desenho mais próximo do exigido pela EFSA visando a comprovação dos efeitos biológicos benéficos destes frutos ou de outros alimentos.



REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. WHO/FAO. Report of a WHO/FAO Expert Consultation. Diet, Nutrition and the Prevention of Chronic Diseases. *WHO Technical Report Series*. 2003(TRS 916):1-160.
2. WHO. Global Status Report on noncommunicable diseases. *WHO Press*. 2014:1-298.
3. Crozier A, Jaganath IB, Clifford MN. Dietary phenolics: chemistry, bioavailability and effects on health. *Nat. Prod. Rep.* 2009;26:1001 - 1043.
4. WCRFAICR. *Food, Nutrition, Physical Activity, and the Prevention of Cancer: a Global Perspective*. Washington, DC: AICR;2007.
5. Del Rio D, Rodriguez-Mateos A, Spencer J, Tognolini M, Borges G, Crozier A. Dietary (poly)phenolics in human health: structures, bioavailability, and evidence of protective effects against chronic diseases. *Antioxid Redox Signal.* . 2013;18(14):1818 - 1892.
6. Rodriguez-Mateos A, Heiss C, Borges G, Crozier A. Berry (poly)phenols and cardiovascular health. *J Agric Food Chem.* . 2014;62(18):3842-3851.
7. Espín J, García-Conesa M, Tomás-Barberán F. Nutraceuticals: facts and fiction. *Phytochemistry*. 2007;68(22-24):2986-3008.
8. Borges G, Degenève A, Mullen W, Crozier A. Identification of Flavonoid and Phenolic Antioxidants in Black Currants, Blueberries, Raspberries, Red Currants, and Cranberries. *J Agric Food Chem.* Dec 2010;58:3905-3909.
9. Mullen W, Yokota T, Lean M, Crozier A. Analysis of ellagitannins and conjugates of ellagic acid and quercetin in raspberry fruits by LC-MSn. *Phytochemistry*. Sep 2003;64(2):617-624.
10. Boudet A. Evolution and current status of research in phenolic compounds. *Phytochemistry*. 2007 Nov-Dec 2007;68(22-24):2722-2735.
11. Prior R. Fruits and vegetables in the prevention of cellular oxidative damage. *Am J Clin Nutr.* Sep 2003;78(3 Suppl):570S-578S.
12. Szajdek A, Borowska E. Bioactive compounds and health-promoting properties of berry fruits: a review. *Plant Foods Hum Nutr.* Dec 2008;63(4):147-156.
13. Halvorsen B, Carlsen M, Phillips K, et al. Content of redox-active compounds (ie, antioxidants) in foods consumed in the United States. *Am J Clin Nutr.* Jul 2006;84(1):95-135.
14. Brown EM, Latimer C, Allsopp P, et al. In Vitro and in Vivo Models of Colorectal Cancer: Antigenotoxic Activity of Berries. *J Agric Food Chem.* Jan 2014.
15. Figueira ME, Câmara MB, Direito R, et al. Chemical characterization of a red raspberry fruit extract and evaluation of its pharmacological effects in experimental models of acute inflammation and collagen-induced arthritis. *Food Funct.* Dec 2014;5(12):3241-3251.
16. Grace MH, Esposito D, Dunlap KL, Lila MA. Comparative Analysis of Phenolic Content and Profile, Antioxidant Capacity, and Anti-inflammatory Bioactivity in Wild Alaskan and Commercial Vaccinium Berries. *J Agric Food Chem.* Nov 2013.
17. Joseph SV, Edirisinghe I, Burton-Freeman BM. Berries: Anti-inflammatory effects in humans. *J Agric Food Chem.* Feb 2014.
18. Parry J, Su L, Moore J, et al. Chemical compositions, antioxidant capacities, and antiproliferative activities of selected fruit seed flours. *J Agric Food Chem.* May 2006;54(11):3773-3778.

19. Giampieri F, Forbes-Hernandez T, Gasparri M, et al. Strawberry as a health promoter: an evidence based review. *Food Funct.* . 2015;6(5):1386-1398. .
20. Skrovankova S, Sumczynski D, Mlcek J, Jurikova T, Sochor J. Bioactive Compounds and Antioxidant Activity in Different Types of Berries. *Int J Mol Sci.* 2015;16(10):24673-24706.
21. GPPAA. Anuário Vegetal (Crop production Yearbook). In: Agro-Alimentar GdPeP, Informação DdSdEeGd, Agro-Alimentares DdEAedM, eds. GPPAA ed: GPPAA - Divisão de Divulgação e Relações Públicas / CASTEL - Publicações e Edições, SA.; 2002.
22. GPP. Anuário Vegetal (Crop Production Yearbook). In: Direcção de Serviços de Estatística MeED, ed. Lisboa: GPP/ CASTEL - Publicações e Edições, SA <http://www.gppaa.min-agricultura.pt/publicacoes.html>. (acedido a 12/08/2009); 2006.
23. Oliveira PB, Fonseca LL, Silva AR. *Framboesa. Tecnologias de Produção*2007.
24. Strik BC. Berry crops: Worldwide area and production systems. *Berry Fruit. Value-Added Products for Health Promotion*. Taylor & Francis Group ed: CRC Press; 2007:3-49.
25. Oliveira PB, Valdivieso T, Esteves A, Mota M, Fonseca LL. *A planta de framboesa. Morfologia e fisiologia*.2007.
26. Sousa MB, Curado T, Vasconcellos FN, Trigo MJ. *Framboesa - Qualidade Pós-Colheita*: INRB/DPA;2007.
27. Oomah BD, Ladet S, Godfrey DV, Liang J, Girard B. Characteristics of raspberry (*Rubus idaeus* L.) seed oil. *Food Chem.* 2000;69.
28. Piironen V, Toivo J, Puupponen-Pimia R, Lampi A-M. Plant sterols in vegetables, fruits and berries. *J.Sci. Food Agric.* 2003;83.
29. Juranic Z, Zizak Z, Tasic S, et al. Antiproliferative action of water extracts of seeds or pulp of five different raspberry cultivars. *Food Chem.* 2005;93:39-45.
30. Oliveira PB, Oliveira CM, Monteiro AA. Pruning Date and Cane Density Affect Primocane Development and Yield of 'Autumn Bliss' Red Raspberry. *Hortscience.* 2004;39(3).
31. Tabela da Composição de Alimentos. Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge (INSA), Ministério da Saúde; 2014.
32. National Nutrient Database for Standard Reference, Release 26. Nutrient Data. U.S. Department of Agriculture, Agriculture Research Service.; 2014 (<http://www.ars.usda.gov/Services/docs.htm?docid=8964>; acedido a 7.05.2014). <http://www.ars.usda.gov/nutrientdata>. Accessed 07.05.2014.
33. Food and Nutrition. Canadian Nutrient File. 2012. <http://webprod.hc-sc.gc.ca/cnf-fce/search-rechercher.do?lang=eng>. Accessed 15.02.2010.
34. Ciqal French food composition table version 2012. French agency for food, environmental and occupational health & safety; 2012.
35. Europeu P, Conselho. Regulamento (UE) n. o 1169/2011 do Parlamento Europeu e do Conselho, de 25 de Outubro de 2011 , relativo à prestação de informação aos consumidores sobre os géneros alimentícios, que altera os Regulamentos (CE) n. o 1924/2006 e (CE) n. o 1925/2006 do Parlamento Europeu e do Conselho e revoga as Directivas 87/250/CEE da Comissão, 90/496/CEE do Conselho, 1999/10/CE da Comissão, 2000/13/CE do Parlamento Europeu e do Conselho, 2002/67/CE e 2008/5/CE da Comissão e o Regulamento (CE) n. o 608/2004 da Comissão (Texto relevante para efeitos do EEE). *JO da UE.* 2011;L304(22.11.2011):18-63.
36. Fineli Food Composition Database Release 16 2013.

37. Tosun M, Ercisli S, Karlidag H, Sengul M. Characterization of red raspberry (*Rubus idaeus* L.) genotypes for their physicochemical properties. *J Food Sci c: Food Chem.* 2009;74(7):C575 - C579.
38. Mazur S, Nes A, Wold A, Remberg S, Aaby K. Quality and chemical composition of ten red raspberry (*Rubus idaeus* L.) genotypes during three harvest seasons. *Food Chem.* . 2014;160:233-240.
39. Remberg SF, Sonstebj A, Aaby K, Heide OM. Influence of postflowering temperature on fruit size and chemical composition of Glen Ample raspeberry (*Rubus idaeus* L.). *J. Agric. Food Chem.* 2010;58:9120-9128.
40. Haffner K, Rosenfeld HJ, Grete Skrede G, Wang L. Quality of red raspberry *Rubus idaeus* L. cultivars after storage in controlled and normal atmospheres *Postharvest Biology and Technology.* 2002(24):279–289.
41. De Ancos B, González EM, Cano MP. Ellagic acid, vitamin C, and total phenolic contents and radical scavenging capacity affected by freezing and frozen storage in raspberry fruit. *J. Agric. Food Chem.* 2000;48:4565-4570.
42. Khanizadeh S, Rekika D, Ehsani-Moghaddam B, et al. Horticultural characteristics and chemical composition of advanced raspberry lines from Quebec and Ontario. *Food Sci. Technol.* 2009;42:893-898.
43. Bobinaitė R, Viškelis P, Venskutonis PR. Variation of total phenolics, anthocyanins, ellagic acid and radical scavenging capacity in various raspberry (*Rubus* spp.) cultivars *Food Chemistry.* 2012;132:1495–1501.
44. Bradish CM, Perkins-Veazie P, Fernandez GE, Xie G, Jia W. Comparison of Flavonoid Composition of Red Raspberries (*Rubus idaeus* L.) Grown in the Southern United States. *J Agric Food Chem.* Dec 2011.
45. Vrhovsek U, Giongo L, Mattivi F, Viola R. A survey of ellagitannin content in raspberry and blackberry cultivars grown in Trentino (Italy). *European Food Research and Technology.* 2008;226(4):817-824.
46. Pantelidis GE, Vasilakakis GA, Duamantidis G. Antioxidant capacity, phenol, anthocyanin and ascorbic acid contents in raspberries, blackberries, red currants, gooseberries and Cornelian cherries. *Food Chem.* 2007;102:777-783.
47. Wang SY, Chen C-T, Wang CY. The influence of light and maturaty on fruit quality and flavonoid content of red raspberries. *Food Chem.* 2009;112:676-684.
48. Vrhovsek U, Palchetti A, Reniero F, Guillou C, Masuero D, Mattivi F. Concentration and mean degree of polymerization of *Rubus* ellagitannins evaluated by optimized acid methanolysis. *J Agric Food Chem.* Jun 2006;54(12):4469-4475.
49. Moura PHA, Campagnolo MA, Pio R, Curi PN, de Assis CN, Silva TC. Fenologia e produção de cultivares de framboeseiras em regiões subtropicais no Brasil *Pesq. agropec. bras.* 2012;47(12):1714-1721.
50. Mikulic-Petkovsek M, Schmitzer V, Slatnar A, Stampar F, Veberic R. Composition of sugars, organic acids, and total phenolics in 25 wild or cultivated berry species. *J Food Sci.* Oct 2012;77(10):C1064-1070.
51. González EM, De Ancos B, Cano MP. Relation between bioactive compounds and free radical-scavenging capacity in berry fruits during frozen storage. *J. Agric. Food Agric.* 2003;83:722-726.
52. Dujmović Purgar D, Duralija B, Voća S, Vokurka A, Ercisli S. A Comparison of Fruit Chemical Characteristics of Two Wild Grown em *Rubus* em Species from Different Locations of Croatia. *Molecules.* 2012;17(9):10390-10398.

53. Atala E, Vásquez L, Speisky H, Lissi E, López-Alarcón C. Ascorbic acid contribution to ORAC values in berry extracts: An evaluation by the ORAC-pyrogallol red methodology. *Food Chem.* 2009;113:331-335.
54. Bushman B, Phillips B, Isbell T, Ou B, Crane J, Knapp S. Chemical composition of caneberry (*Rubus* spp.) seeds and oils and their antioxidant potential. *J Agric Food Chem.* Dec 2004;52(26):7982-7987.
55. Oomah BD, Ladet S, Godfrey DV, Liang J, Girard B. Characteristics of raspberry (*Rubus idaeus* L.) seed oil. *Food Chem.* 2000;69:187-193.
56. Xu Y, Zhang Y, Chen M, Tu P. Fatty acids, tocopherols and proanthocyanidins in bramble seeds. *Food Chem.* 2006;99:586-590.
57. Serrano J, Puupponen-Pimiä R, Dauer A, Aura AM, Saura-Calixto F. Tannins: current knowledge of food sources, intake, bioavailability and biological effects. *Mol Nutr Food Res.* Sep 2009;53 Suppl 2:S310-329.
58. Prottogente AR, Rice-Evans CA, Wiseman S, van de Put FHMM. The Relationship Between the Phenolic Composition and the Antioxidant Activity of Fruits and Vegetables. In: Rives-Evans CA, Packer L, eds. *Flavonoids in Health and Disease*: Marcel Dekker, Inc.; 2003:71 - 95.
59. Bakkalbasi E, Montes O, Artik N. Food Ellagitannins . Occurrence, Effects of Processing and Storage. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 2009;49(3):283-298.
60. Naczki M, Shahidi F. Phenolics in cereals, fruits and vegetables: occurrence, extraction and analysis. *J Pharm Biomed Anal.* Aug 2006;41(5):1523-1542.
61. Ordidge M, García-Macías P, Battey NH, et al. Phenolic contents of lettuce, strawberry, raspberry and blueberry crops cultivated under plastic films varying in ultraviolet transparency. *Food Chem.* 2010;119:1224-1227.
62. Anttonen MJ, Karjalainen RO. Environmental and genetic variation of phenolic compounds in red raspberry. *J. Food Composit. Anal.* 2005;18:759-769.
63. Plessi M, Bertelli D, Albasini A. Distribution of metals and phenolic compounds as a criterion to evaluate variety of berries and related jams. *Food Chem.* 2007;100:419-427.
64. Khanbababee K, van Ree T. Tannins: classification and definition. *Nat. Prod. Rep.* 2001;18:641 - 649.
65. Mullen W, Stewart A, Lean M, Gardner P, Duthie G, Crozier A. Effect of freezing and storage on the phenolics, ellagitannins, flavonoids, and antioxidant capacity of red raspberries. *J Agric Food Chem.* Aug 2002;50(18):5197-5201.
66. Maatta-Riihinen KR, Kamal-Eldin A, Torronen AR. Identification and quantification of phenolic compounds in berries of *Fragaria* and *Rubus* species (Family rosaceae). *Journal of Agricultural and Food Chemistry.* 2004;52(20):6178-6187.
67. Nohynek LJ, Alakomi HL, Kähkönen MP, et al. Berry phenolics: antimicrobial properties and mechanisms of action against severe human pathogens. *Nutr Cancer.* 2006;54(1):18-32.
68. Liu M, Li X, Weber C, Lee C, Brown J, Liu R. Antioxidant and antiproliferative activities of raspberries. *J Agric Food Chem.* May 2002;50(10):2926-2930.
69. Chen L, Xin X, Yuan Q, Su D, Liu W. Phytochemical properties and antioxidant capacities of various colored berries. *J Sci Food Agric.* Jan 2014;94(2):180-188.
70. de Souza VR, Pereira PA, da Silva TL, de Oliveira Lima LC, Pio R, Queiroz F. Determination of the bioactive compounds, antioxidant activity and chemical composition of Brazilian blackberry, red raspberry, strawberry, blueberry and sweet cherry fruits. *Food Chem.* Aug 2014;156:362-368.

71. Wada L, Ou B. Antioxidant activity and phenolic content of Oregon caneberries. *J Agric Food Chem.* Jun 2002;50(12):3495-3500.
72. Ross H, McDougall G, Stewart D. Antiproliferative activity is predominantly associated with ellagitannins in raspberry extracts. *Phytochemistry.* Jan 2007;68(2):218-228.
73. Beekwilder J, Jonker H, Meesters P, Hall R, van der Meer I, Ric de Vos C. Antioxidants in raspberry: on-line analysis links antioxidant activity to a diversity of individual metabolites. *J Agric Food Chem.* May 2005;53(9):3313-3320.
74. Sariburun E, Sahin S, Demir C, Turkben C, Uylaser V. Phenolic content and antioxidant activity of raspberry and blackberry cultivars. *J. Food Sci.:Food Chemistry.* 2010;75(4):C328 - C335.
75. González-Barrio R, Borges G, Mullen W, Crozier A. Bioavailability of Anthocyanins and Ellagitannins Following Consumption of Raspberries by Healthy Humans and Subjects with an Ileostomy. *J. Agric. Food Chem.* 2010;58:3933-3939.
76. Kassim A, Poette J, Paterson A, et al. Environmental and seasonal influences on red raspberry anthocyanin antioxidant contents and identification of quantitative traits loci (QTL). *Mol. Nutr. Food Res.* 2009;53:625-634.
77. Mullen W, McGinn J, Lean M, et al. Ellagitannins, flavonoids, and other phenolics in red raspberries and their contribution to antioxidant capacity and vasorelaxation properties. *J Agric Food Chem.* Aug 2002;50(18):5191-5196.
78. Borges G, Roowi S, Rouanet J, Duthie G, Lean M, Crozier A. The bioavailability of raspberry anthocyanins and ellagitannins in rats. *Mol Nutr Food Res.* Jun 2007;51(6):714-725.
79. Puupponen-Pimiä R, Nohynek L, Alakomi HL, Oksman-Caldentey KM. The action of berry phenolics against human intestinal pathogens. *Biofactors.* 2005;23(4):243-251.
80. Prottogente AR, Pannala AS, Paganga G, et al. The antioxidant activity of regularly consumed fruit and vegetables reflects their phenolic and vitamin C composition. *Free Radical Res.* 2002;36:217-233.
81. Seeram NP, Adams LS, Y. Z, et al. Blackberry, Black Raspberry, Blueberry, Cranberry, Red Raspberry, and Strawberry extracts inhibit growth and stimulate apoptosis of human cancer cells in vitro. *J. Agric. Food Chem.* 2006;54:9329 - 9339.
82. Roy S, Khanna S, Alessio HM, et al. Anti-angiogenic property of edible berries. *Free Radical Research.* 2002;36(9):1023-1031.
83. Turkden C, Sariburun E, Demir C, Uylaser V. Effect of freezing and frozen storage on phenolic compounds of raspberry and blackberry cultivars. *Food Anal Methods.* 2009.
84. Zafrilla P, Ferreres F, Tomás-Barberán F. Effect of Processing and Storage on the Antioxidant Ellagic Acid Derivates and Flavonoids of Red Raspberry (*Rubus idaeus*) Jams. *J. Agric. Food Chem.* 2001;49:3651-3655.
85. Stewart D, McDougall G, Sungurtas J, Verrall S, Graham J, Martinussen I. Metabolomic approach to identifying bioactive compounds in berries: advances toward fruit nutritional enhancement. *Mol Nutr Food Res.* Jun 2007;51(6):645-651.
86. Russell WR, Labat A, Scobbie L, Duncan GJ, Duthie GG. Phenolic acid content of fruits commonly consumed and locally produced in Scotland. *Food Chem.* 2009;115:100-104.
87. Mattila P, Hellström J, Törrönen R. Phenolic acids in berries, fruits, and beverages. *J Agric Food Chem.* Sep 2006;54(19):7193-7199.
88. McDougall G, Martinussen I, Stewart D. Towards fruitful metabolomics: high throughput analyses of polyphenol composition in berries using direct infusion mass

- spectrometry. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* Aug 2008;871(2):362-369.
89. Gasperotti M, Masuero D, Vrhovsek U, G. G, Mattivi F. Profiling and Accurate quantification of Rubus Ellagitannins and Ellagic acid Conjugates Using Direct UPLC-Q-TOF HDMS and HPLC-DAD Analysis. *J. Agric. Food Chem.* 2010;58:4602-4616.
90. Gu L, Kelm M, Hammerstone J, et al. Concentrations of proanthocyanidins in common foods and estimations of normal consumption. *J Nutr.* Mar 2004;134(3):613-617.
91. Hellstrom JK, Torronen AR, Mattila PH. Proanthocyanidins in common food products of plant origin. *J.Agric. Food Chem.* 2009;57:7899 - 7906.
92. Meagher LP, Beecher GR. Assessment of data on the lignan content of foods. *J. Food Composit. Anal.* 2000;13.
93. Serrano J, Puupponen-Pimia R, Dauer A, Aura A-M, Saura-Calixto F. Tannins: Current knowledge of food sources, intake, bioavailability and biological effects. *Mol. Nutr. Food Res.* 2009;53:S310-S329.
94. Clifford MN, Scalbert A. Ellagitannins - nature, occurrence and dietary burden. *J. Sc. Food Agric.* 2000;80:1118 - 1125.
95. Koponen JM, Happonen AM, Mattila PH, Torronen AR. Contents of Anthocyanins and Ellagitannins in Selected Foods Consumed in Finland. *J.Agric. Food Chem.* 2007;55:1612-1619.
96. Mullen W, Stewart A, Lean M, Gardner P, Duthie G, Crozier A. Effect of freezing and storage on the phenolics, ellagitannins, flavonoids, and antioxidant capacity of red raspberries. *J Agric Food Chem.* Aug 2002;50(18):5197-5201.
97. Wu X, Beecher GR, Holden JM, Haytowitz DB, Gebhardt SE, Prior RL. Concentrations of anthocyanins in common foods in the United States and estimation of normal consumption. *J Agric Food Chem.* May 2006;54(11):4069-4075.
98. Clifford MN. Anthocyanins - nature, occurrence and dietary burden. *J. Sci. Food Agric.* 2000;80:1063-1072.
99. Pascual-Teresa S, Sanchez-Ballesta MT. Anthocyanins: from plant to health. *Phytochem Rev.* 2008;7:281-299.
100. Moncada M. *Estudos em derivados do 2-Fenil-1-Benzopirílio*. Lisboa, Universidade Nova de Lisboa, Faculdade de Ciências e Tecnologias; 2006.
101. Beattie J, Crozier A, Duthie GG. Potential Health Benefits of Berries. *Current Nutrition & Food Science.* 2005(I):71 - 86.
102. Prior R, Gu L. Occurrence and biological significance of proanthocyanidins in the American diet. *Phytochemistry.* Sep 2005;66(18):2264-2280.
103. Rao AV, Snyder DM. Raspberries and Human Health: A Review. *J. Agric. Food Chem.* 2010; 58:3871-3883.
104. Mazur WM, Uehara M, Wahala K, Adlercreutz H. Phyto-oestrogen content of berries, and plasma concentrations and urinary excretion of enterolactone after a single strawberry-meal in human subjects. *Br. J. Nutr.* 2000;83.
105. Cassidy A, Handley B, Lamuela-Raventos R. Isoflavones, lignans and stilbenes - origins, metabolism and potential importance to human health. *J. Sci. Food Agric.* 2000;80:1044 - 1062.
106. Smeds AI, Eklund PC, SjöWillholm RE, et al. Quantification of a Broad Spectrum of Lignans in Cereals, Oilseeds, and Nuts. *J. Agric. Food Chem.* 2007;55:1337-1346.

107. Mullen W, Lean M, Crozier A. Rapid characterization of anthocyanins in red raspberry fruit by high-performance liquid chromatography coupled to single quadrupole mass spectrometry. *J Chromatogr A*. Aug 2002;966(1-2):63-70.
108. Aguirre MJ, Chen YY, Isaacs M, Matsuhira B, Mendoza L, Torres S. Electrochemical behaviour and antioxidant capacity of anthocyanins from Chilean red wine, grape and raspberry. *Food Chem*. 2010;121:44-48.
109. Puupponen-Pimiä R, Nohynek L, Meier C, et al. Antimicrobial properties of phenolic compounds from berries. *J Appl Microbiol*. Apr 2001;90(4):494-507.
110. Dalle-Donne I, Rossi R, Colombo R, Giustarini D, Milzani A. Biomarkers of oxidative damage in human disease. *Clin. Chem*. 2006;52(4):601-623.
111. Gu L, Kelm M, Hammerstone J, et al. Screening of foods containing proanthocyanidins and their structural characterization using LC-MS/MS and thiolytic degradation. *J Agric Food Chem*. Dec 2003;51(25):7513-7521.
112. Puupponen-Pimiä R, Nohynek L, Hartmann-Schmidlin S, et al. Berry phenolics selectively inhibit the growth of intestinal pathogens. *J Appl Microbiol*. 2005;98(4):991-1000.
113. Almiron-Roig E, Flores SY, Drewnowski A. No difference in satiety or in subsequent energy intakes between a beverage and a solid food. *Physiol Behav*. Sep 30 2004;82(4):671-677.
114. González-Barrio R, Truchado P, Ito H, Espín JC, Tomás-Barberán FA. UV and MS identification of Urolithins and Nasutins, the bioavailable metabolites of ellagitannins and ellagic acid in different mammals. *J Agric Food Chem*. Feb 2011;59(4):1152-1162.
115. Çam M, Hisil Y. Pressurised water extraction of polyphenols from pomegranate peels. *Food Chemistry*. 2010;123:878-885.
116. Croxatto A, Prod'homme G, Greub G. Applications of MALDI-TOF mass spectrometry in clinical diagnostic microbiology. *FEMS Microbiol Rev*. 2012;36(2):380-407.
117. Kalt W, Forney CF, Martin A, Prior LR. Antioxidant Capacity, Vitamin C, Phenolics, and Anthocyanins after fresh Storage of Small Fruits. *J. Agric. Food Chem*. 1999;47(11):4638 - 4644.
118. Seeram NP, Momin RA, Bourquin LD. Cyclooxygenase inhibitory and antioxidant cyanidin glycosides in cherries and berries. *Phytomedicine*. 2001;8(5):362-369.
119. Halvorsen BL, Holte K, Myhrstad MCW, et al. A systematic screening of total antioxidants in dietary plants. *J. Nutr*. 2002;132:461-471.
120. Wu X, Beecher GR, Holden JM, Haytowitz DB, Gebhardt SE, Prior RL. Lipophilic and hydrophilic antioxidant capacities of common foods in the United States. *J. Agric. Food Chem*. 2004;52:4026-4037.
121. García-Alonso M, Pascual-Teresa S, Santos-Buelga C, Rivas-Gonzalo JC. Evaluation of antioxidant properties of fruits. *Food Chem*. 2004;84:13-18.
122. Viljanen K, Kylli P, Kivikari R, Heinonen M. Inhibition of protein and lipid oxidation in liposomes by berry phenolics. *J Agric Food Chem*. Dec 2004;52(24):7419-7424.
123. Vuorela S, Kreander K, Karonen M, et al. Preclinical evaluation of rapeseed, raspberry, and pine bark phenolics for health related effects. *J Agric Food Chem*. Jul 2005;53(15):5922-5931.
124. Orgen M, Reese RN, A.Z. TJ, Scheerens JC, Miller AR. Modified 2,2-Azino-bis-3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid (ABTS) method to measure antioxidant capacity of selected small fruits and comparison of ferric reducing antioxidant power (FRAP) and 2,2'-Diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) methods. *J. Agric. Food Chem*. 2006;54:1151 - 1157.

125. Wolfe KL, R.H. L. Cellular antioxidant activity (CAA) assay for assessing antioxidants, foods, and dietary supplements. *J. Agric. Food Chem.* 2007;55:8896-8907.
126. Gryszczynska B, Iskra M, Malecka M, Wielkoszynski T. Raspberry seed extract effect on the ferroxidase activity of ceroloplasmin isolated from plasma. *Food Chem.* 2009;112.
127. Zhang L, Li J, Hogan S, Chung H, Welbaum GE, Zhou K. Inhibitory effect of raspberries on starch digestive enzyme and their antioxidant properties and phenolic composition. *Food Chem.* 2010;119(2):592-599.
128. Beekwilder J, Hall R, de Vos C. Identification and dietary relevance of antioxidants from raspberry. *Biofactors.* 2005;23(4):197-205.
129. Puupponen-Pimiä R, Nohynek L, Alakomi HL, Oksman-Caldentey KM. Bioactive berry compounds-novel tools against human pathogens. *Appl Microbiol Biotechnol.* Apr 2005;67(1):8-18.
130. Rauha JP, Remes S, Heinonen M, et al. Antimicrobial effects of Finnish plant extracts containing flavonoids and other phenolic compounds. *Int J Food Microbiol.* May 2000;56(1):3-12.
131. Morimoto C, Satoh Y, Hara M, Inoue S, Tsujita T, Okuda H. Anti-obese action of raspberry ketone. *Life Sciences.* 2005;77:194-204.
132. McDougall GJ, Kulkarni NN, Stewart D. Berry polyphenols inhibit pancreatic lipase activity in vitro. *Food Chem.* 2009;115:193-199.
133. McDougall J, Stewart D. The inhibitory effects of berry polyphenols on digestive enzymes. *BioFactors.* 2005;23:189-195.
134. Jakobsdottir G, Nilsson U, Blanco N, Sterner O, Nyman M. Effects of soluble and insoluble fractions from bilberries, black currants, and raspberries on short-chain fatty acid formation, anthocyanin excretion, and cholesterol in rats. 2014. *J Agric Food Chem.* ;62(19):4359-4368. .
135. Wang S, Meckling KA, Marcone MF, Kakuda Y, Tsao R. Synergistic, additive, and antagonistic effects of food mixtures on total antioxidant capacities. *J Agric Food Chem.* Feb 2011;59(3):960-968.
136. Skrovankova S, Sumczynski D, Mlcek J, Jurikova T, Sochor J. Bioactive Compounds and Antioxidant Activity in Different Types of Berries. . *Int J Mol Sci.* . 2015;16(10):24673-24706.
137. Li J, Du L, He Y, et al. Chemical Constituents and Biological Activities of Plants from the Genus *Rubus*. *Chem Biodivers.* 2015;12(12):1809-1847.
138. Kähkönen M, Kylli P, Ollilainen V, Salminen JP, Heinonen M. Antioxidant activity of isolated ellagitannins from red raspberries and cloudberries. *J Agric Food Chem.* Feb 2012;60(5):1167-1174.
139. Dobson P, Graham J, Stewart D, Brennan R, Hackett CA, McDougall GJ. Over-seasons analysis of quantitative trait loci affecting phenolic content and antioxidant capacity in raspberry. *J Agric Food Chem.* May 2012;60(21):5360-5366.
140. Li L, Wang L, Wu Z, et al. Anthocyanin-rich fractions from red raspberries attenuate inflammation in both RAW264.7 macrophages and a mouse model of colitis. . *Sci Rep.* . 2014;29(6234):1-21.
141. Jean-Gilles D, Li L, Ma H, Yuan T, Chichester CO, Seeram NP. Anti-inflammatory Effects of Polyphenolic-Enriched Red Raspberry Extract in an Antigen-Induced Arthritis Rat Model *J. Agric. Food Chem.* 2012;60:5755–5762.

142. Sangiovanni E, Vrhovsek U, Rossoni G, et al. Ellagitannins from Rubus Berries for the Control of Gastric Inflammation: In Vitro and In Vivo Studies *PLOS One*. 2013;8(8):1-12.
143. Suh JH, Romain C, González-Barrio R, et al. Raspberry juice consumption, oxidative stress and reduction of atherosclerosis risk factors in hypercholesterolemic golden Syrian hamsters. *Food Funct*. Jul 2011;2(7):400-405.
144. Chen HS, Liu M, Shi LJ, et al. Effects of raspberry phytochemical extract on cell proliferation, apoptosis, and serum proteomics in a rat model. *J Food Sci*. Oct 2011;76(8):T192-198.
145. Hsieh Y, Chu S, Hsu L, et al. Rubus idaeus L. reverses epithelial-to-mesenchymal transition and suppresses cell invasion and protease activities by targeting ERK1/2 and FAK pathways in human lung cancer cells. *Food Chem Toxicol*. . 2013;62:908-918.
146. Woode D, Aiyer H, Sie N, et al. Effect of Berry Extracts and Bioactive Compounds on Fulvestrant (ICI 182,780) Sensitive and Resistant Cell Lines. *Int J Breast Cancer*. . 2012;doi:10.1155/2012/147828:1-11.
147. Chu S, Hsieh Y, Hsu L, Chen K, Chiang C, Chen P. Rubus idaeus L Inhibits Invasion Potential of Human A549 Lung Cancer Cells by Suppression Epithelial-to-Mesenchymal Transition and Akt Pathway In Vitro and Reduces Tumor Growth In Vivo. *Integr Cancer Ther*. 2013;13(3):259-273.
148. Sousa M, Machado V, ME F, et al. Red Raspberry Phenols Inhibit Angiogenesis: A Morphological and Subcellular Analysis Upon Human Endothelial Cells. *J Cell Biochem*. . 2015; 2015 Nov 21.
149. Khalifa H, Kamimoto M, Shimamoto T, Shimamoto T. Antimicrobial Effects of Blueberry, Raspberry, and Strawberry Aqueous Extracts and their Effects on Virulence Gene Expression in *Vibrio cholerae*. *Phytother Res*. . 2015;29(11):1791-1797.
150. Yu Z, Liu L, Xu Y, et al. Characterization and biological activities of a novel polysaccharide isolated from raspberry (*Rubus idaeus* L.) fruits. . *Carbohydr Polym*. . 2015;132:180-186.
151. Takata T, Morimoto C. Raspberry ketone promotes the differentiation of C3H10T1/2 stem cells into osteoblasts. *J Med Food*. . 2014;17(3):332-338.
152. Grussu D, Stewart D, McDougall GJ. Berry polyphenols inhibit α -amylase in vitro: identifying active components in rowanberry and raspberry. *J Agric Food Chem*. Mar 2011;59(6):2324-2331.
153. Freese R, Vaarala O, Turpeinen AM, Mutanen M. No difference in platelet activation or inflammation markers after diets rich or poor in vegetables, berries and apple in healthy subjects. *Eur. J. Nutr*. 2004;43:175-182.
154. Almendingen K, Brevik A, Nymoen D, Hilmarsen HT, Andresen LF, Vatn M. Modulation of COX-2 expression in peripheral blood cells by increased intake of fruit and vegetables? *Eur. J. of Clinical Nutr*. 2005;59:597-602.
155. Pellegrini N, Serafini M, Colombi B, et al. Total antioxidant capacity of plant foods, beverages and oils consumed in Italy assessed by three different in vitro assays. *J Nutr*. Sep 2003;133(9):2812-2819.
156. Pérez-Jiménez J, Arranz S, Tabernero M, et al. Updatet methodology to determine antioxidant capacity in plant foods, oils and beverages: Extraction, measurement and expression of results. *Food Res. Int*. 2008;41:274-285.

157. Pan M-H, Lai C-S, Dushenkov S, Ho C-T. Modulation of inflammatory genes by natural dietary bioactive compounds. *J.Agric.Food Chem.* 2009;57:4467-4477.
158. Knasmuller S, Nersesyan A, Misik M, et al. Use of conventional and -omics based methods for health claims of dietary antioxidants: a critical review. *British J. Nutr.* 2008;99(E-Suppl. 1):ES3-ES52.
159. Wolfe KL, Kang X, He X, Dong M, Zhang Q, Liu RH. Cellular antioxidant activity of common fruits. *J. Agric. Food Chem.* 2008;56:8418-8426.
160. Prior RL, Wu X, Schaich K. Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. *J. Agric. Food Chem.* 2005;53:4290-4302.
161. Beretta G, Facino R. Recent advances in the assessment of the antioxidant capacity of pharmaceutical drugs: from in vitro to in vivo evidence. *Anal Bioanal Chem.* Sep 2010;398(1):67-75.
162. EFSA/NDA. Draft guidance on scientific requirements for health claims related to antioxidants, oxidative damage and cardiovascular health released for public consultation. *EFSA Journal.* 2011;20xx;x(x)(12 pp.): (acessível em www.efsa.europa.eu/efsajournal).
163. Halvorsen B, Holte K, Myhrstad M, et al. A systematic screening of total antioxidants in dietary plants. *J Nutr.* Mar 2002;132(3):461-471.
164. Yokomizo A, Moriwaki M. Effects of uptake of flavonoids on oxidative stress induced by hydrogen peroxide in human intestinal Caco-2 cells. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 2006;70(6):1317-1324.
165. Lukens JR, Gross JM, Kanneganti TD. IL-1 family cytokines trigger sterile inflammatory disease. *Front Immunol.* 2012;9(3):1-12.
166. Alwan A, Maclean DR, Riley LM, et al. Monitoring and surveillance of chronic non-communicable diseases: progress and capacity in high-burden countries. *Lancet.* Nov 2010;376(9755):1861-1868.
167. Calder PC, Albers R, Antoine J-M, et al. Inflammatory disease process and interactions with nutrition. *British J. Nutr.* 2009;101:S1-S45.
168. Calder PC. Polyunsaturated fatty acids and inflammatory processes: New twists in an old tale. *Biochimie.* Jun 2009;91(6):791-795.
169. Lawrence T, Willoughby DA, Gilroy DW. Anti-inflammatory lipid mediators and insights into the resolution of inflammation *Nature Immunol. Reviews.* 2002;2:787-795.
170. Calder PC, Kew S. The immune system: a target for functional foods? *Br J Nutr.* Nov 2002;88 Suppl 2:S165-177.
171. Calder PC, Ahluwalia N, Brouns F, et al. Dietary factors and low-grade inflammation in relation to overweight and obesity. *Br J Nutr.* Dec 2011;106 Suppl 3:S5-78.
172. Kumar V, Abbas AK, Aster JC. Inflammation and Repair. In: Kumar V, Abbas AK, Aster JC, eds. *Robbins Basic Pathology*. 9th ed. Canada: Elsevier Saunders; 2012:29-74.
173. Tomé-Carneiro J, González M, Larrosa M, et al. One-year consumption of a grape nutraceutical containing resveratrol improves the inflammatory and fibrinolytic status of patients in primary prevention of cardiovascular disease. *Am J Cardiol.* Aug 2012;110(3):356-363.
174. Ryan GB, Majno G. Acute inflammation. A review. *Am J Pathol.* Jan 1977;86(1):183-276.

175. Walker BAM, Fantone JC. The inflammatory response. In: Sigal LH, Ron Y, eds. *Immunology and Inflammation. Basic Mechanisms and Clinical Consequences*. 1st ed. Singapore: McGraw-Hill International Editions; 1994:359-386.
176. Sprague AH, Khalil RA. Inflammatory cytokines in vascular dysfunction and vascular disease. *Biochem Pharmacol*. Sep 2009;78(6):539-552.
177. Yost CC, Weyrich AS, Zimmerman GA. The platelet activating factor (PAF) signaling cascade in systemic inflammatory responses. *Biochimie*. 2010;92(6):692-697.
178. Roda JM, Eubank TD. The cellular component of chronic inflammation. In: Roy S, Bagchi D, Raychaudhuri SP, eds. *Chronic inflammation. Molecular pathophysiology, Nutritional and Therapeutic Interventions*. 1st ed. London, New York: CRC Press; 2013.
179. Nathan C, Ding A. Nonresolving Inflammation. *Cell*. 2010;140(March 19):871-882.
180. Lentsch AB, Ward PA. Regulation of inflammatory vascular damage. *J Pathol*. Feb 2000;190(3):343-348.
181. Kobayashi SD, Voyich JM, Burlak C, DeLeo FR. Neutrophils in the innate immune response. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)*. 2005 Nov-Dec 2005;53(6):505-517.
182. Ley K, Laudanna C, Cybulsky MI, Nourshargh S. Getting to the site of inflammation: the leukocyte adhesion cascade updated *Nature*. 2007;7:678-689.
183. Serhan CN, Chiang N, Van Dyke TE. Resolving inflammation: dual anti-inflammatory and pro-resolution lipid mediators. *Nat Rev Immunol*. May 2008;8(5):349-361.
184. Shaw PJ, Lamkanfi M, Kanneganti TD. NOD-like receptor (NLR) signaling beyond the inflammasome. *Eur J Immunol*. Mar 2010;40(3):624-627.
185. Loo YM, Gale M. Immune signaling by RIG-I-like receptors. *Immunity*. May 2011;34(5):680-692.
186. Schroder K, Tschopp J. The Inflammasomes. *Cell*. 2010;140(March 19):821-832.
187. Creagh EM, O'Neill LA. TLRs, NLRs and RLRs: a trinity of pathogen sensors that co-operate in innate immunity. *Trends Immunol*. Aug 2006;27(8):352-357.
188. Hall JC, Rosen A. Type I interferons: crucial participants in disease amplification in autoimmunity. *Nat Rev Rheumatol*. Jan 2010;6(1):40-49.
189. Martinon F, Pétrilli V, Mayor A, Tardivel A, Tschopp J. Gout-associated uric acid crystals activate the NALP3 inflammasome. *Nature*. Mar 2006;440(7081):237-241.
190. Calder PC, Ahluwalia N, Albers R, et al. A consideration of biomarkers to be used for evaluation of inflammation in human nutritional studies. *Br J Nutr*. Jan 2013;109 Suppl 1:S1-34.
191. Dray A. Inflammatory mediators of pain. *British Journal of Anaesthesia*. 1995;75:125 - 131.
192. Rosa AC, Fantozzi R. The role of histamine in neurogenic inflammation. *Br J Pharmacol*. Sep 2013;170(1):38-45.
193. Duerschmied D, Suidan GL, Demers M, et al. Platelet serotonin promotes the recruitment of neutrophils to sites of acute inflammation in mice. *Blood*. Feb 2013;121(6):1008-1015.
194. Díez-Dacal B, Pérez-Sala D. Anti-inflammatory prostanoids: focus on the interactions between electrophile signaling and resolution of inflammation. *ScientificWorldJournal*. 2010;10:655-675.
195. Miles EA, Allen E, Calder PC. In vitro effects of eicosanoids derived from different 20-carbon Fatty acids on production of monocyte-derived cytokines in human whole blood cultures. *Cytokine*. Dec 2002;20(5):215-223.

196. Vachier I, Chanez P, Bonnans C, Godard P, Bousquet J, Chavis C. Endogenous anti-inflammatory mediators from arachidonate in human neutrophils. *Biochem Biophys Res Commun*. Jan 2002;290(1):219-224.
197. Chen H, Takahara M, Xie L, et al. Lipoxin A(4), a potential anti-inflammatory drug targeting the skin. *J Dermatol Sci*. Apr 2011;62(1):67-69.
198. Martins V, Valença SS, Farias-Filho FA, et al. ATLa, an aspirin-triggered lipoxin A4 synthetic analog, prevents the inflammatory and fibrotic effects of bleomycin-induced pulmonary fibrosis. *J Immunol*. May 2009;182(9):5374-5381.
199. Stamatakis K, Pérez-Sala D. Prostanoids with cyclopentenone structure as tools for the characterization of electrophilic lipid-protein interactomes. *Ann N Y Acad Sci*. Dec 2006;1091:548-570.
200. Calder PC. Long-chain fatty acids and inflammation. *Proc Nutr Soc*. May 2012;71(2):284-289.
201. Prescott SM, Zimmerman GA, Stafforini DM, McIntyre TM. Platelet-activating factor and related lipid mediators. *Annu Rev Biochem*. 2000;69:419-445.
202. Ishii S, Nagase T, Shimizu T. Platelet-activating factor receptor. *Prostaglandins Other Lipid Mediat*. Aug 2002;68-69:599-609.
203. Gaur U, Aggarwal BB. Regulation of proliferation, survival and apoptosis by members of the TNF superfamily. *Biochem Pharmacol*. Oct 2003;66(8):1403-1408.
204. Ouyang W, Rutz S, Crellin NK, Valdez PA, Hymowitz SG. Regulation and functions of the IL-10 family of cytokines in inflammation and disease. *Annu Rev Immunol*. 2011;29:71-109.
205. Schroder K, Hertzog PJ, Ravasi T, Hume DA. Interferon-gamma: an overview of signals, mechanisms and functions. *J Leukoc Biol*. Feb 2004;75(2):163-189.
206. Hsieh H, Yang C. Role of redox signaling in neuroinflammation and neurodegenerative diseases. *Biomed Res Int*. . 2013;2013:484613.
207. Yoshihara E, Masaki S, Matsuo Y, Chen Z, Tian H, Yodoi J. Thioredoxin/Txnip: Redoxosome, as a Redox Switch for the Pathogenesis of Diseases. *Front Immunol*. . 2014(Jan 9).
208. Kumar V, Abbas AK, Aster JC. Mechanisms of Cell Injury. In: Kumar V, Abbas AK, Aster JC, eds. *Robbins Basic Pathology*. 9th ed. Canada: Elsevier Saunders; 2012:1-26.
209. Ballanti E, Perricone C, di Muzio G, et al. Role of the complement system in rheumatoid arthritis and psoriatic arthritis: relationship with anti-TNF inhibitors. *Autoimmun Rev*. Aug 2011;10(10):617-623.
210. Janeway CAJ, Travers P, Walport M, al. e. The complement system and innate immunity. . *Immunobiology: The Immune System in Health and Disease*. 5th, Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK27100/> ed. New York: Garland Science; 2001.
211. Strietholt S, Maurer B, Peters MA, Pap T, Gay S. Epigenetic modifications in rheumatoid arthritis. *Arthritis Res. Ther*. 2008;10(5):219-227.
212. Mantovani A, Cassatella MA, Costantini C, Jaillon S. Neutrophils in the activation and regulation of innate and adaptive immunity. *Nat Rev Immunol*. Aug 2011;11(8):519-531.
213. Jaillon S, Galdiero MR, Del Prete D, Cassatella MA, Garlanda C, Mantovani A. Neutrophils in innate and adaptive immunity. *Semin Immunopathol*. Jul 2013;35(4):377-394.

214. Costa D, Marques AP, Reis RL, Lima JLFC, Fernandes E. Inhibition of human neutrophil oxidative burst by pyrazolone derivatives. *Free Radical Biology & Medicine*. 2006(40):632 – 640.
215. Ribeiro D, Freitas M, Tomé SM, Silva AMS, Porto G, Fernandes E. Modulation of human neutrophils' oxidative burst by flavonoids. *European Journal of Medicinal Chemistry*. 2013(67):280 - 292.
216. Freitas M, Lima JLFC, Fernandes E. Optical probes for detection and quantification of neutrophils' oxidative burst. A review *Analytica Chimica Acta*. 2009(649):8–23.
217. Freitas M, Costa VM, Ribeiro D, et al. Acetaminophen prevents oxidative burst and delays apoptosis in human neutrophils *Toxicology Letters*. 2013(219):170-177.
218. Webb DR. Animal models of human disease: inflammation. *Biochem Pharmacol*. Jan 2014;87(1):121-130.
219. Oguz A, Kapan M, Onder A, et al. The effects of curcumin on the liver and remote organs after hepatic ischemia reperfusion injury formed with Pringle manoeuvre in rats. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*. Feb 2013;17(4):457-466.
220. Naveed S, Sultana N, Arayne M, Mehboob M. In vivo Interaction Studies of ACE Inhibitors with NSAIDs on CarrageenanInduced Inflammation. *Clinic Pharmacol Biopharm*. 2013;2 (1:<http://dx.doi.org/10.4172/2167-065X.1000108>):1-4).
221. Morris CJ. Carrageenan-Induced Paw Edema in the Rat and Mouse. In: Winyard PG, Willoughby DA, eds. *Inflammation Protocols*. Vol 225. New Jersey: Human Press Inc; 2003:115-121.
222. Fezai M, Senovilla L, Jemaà M, Ben-Attia M. Analgesic, anti-inflammatory and anticancer activities of extra virgin olive oil. *J Lipids*. . 2013;2013:129736(doi: 10.1155/2013/129736.).
223. Singh R, Akhtar N, Haqqi TM. Green tea polyphenol epigallocatechin-3-gallate: inflammation and arthritis. [corrected]. *Life Sci*. Jun 2010;86(25-26):907-918.
224. Rotelli AE, Guardia T, Juárez AO, de la Rocha NE, Pelzer LE. Comparative study of flavonoids in experimental models of inflammation. *Pharmacol Res*. Dec 2003;48(6):601-606.
225. Scott DL, Wolfe F, Huizinga TW. Rheumatoid arthritis. *Lancet*. Sep 2010;376(9746):1094-1108.
226. Klareskog L, Catrina AI, Paget S. Rheumatoid arthritis. *Lancet*. Feb 2009;373(9664):659-672.
227. Fan W, Zhou ZY, Huang XF, Bao CD, Du F. Deoxycytidine kinase promotes the migration and invasion of fibroblast-like synoviocytes from rheumatoid arthritis patients. *Int J Clin Exp Pathol*. 2013;6(12):2733-2744.
228. Boissier MC, Semerano L, Challal S, Saidenberg-Kermanac'h N, Falgarone G. Rheumatoid arthritis: from autoimmunity to synovitis and joint destruction. *J Autoimmun*. Sep 2012;39(3):222-228.
229. Myasoedova E, Crowson CS, Kremers HM, Therneau TM, Gabriel SE. Is the incidence of rheumatoid arthritis rising?: results from Olmsted County, Minnesota, 1955-2007. *Arthritis Rheum*. Jun 2010;62(6):1576-1582.
230. Alamanos Y, Drosos AA. Epidemiology of adult rheumatoid arthritis. *Autoimmun Rev*. Mar 2005;4(3):130-136.
231. Ramiro S, Canhão H, Branco JC. EPIREUMAPT Protocol - Portuguese epidemiologic study of the Rheumatic Diseases. *Acta Reumatol Port*. 2010;35:384-390.
232. Aggett PJ, Alexander J, Alles M, et al. Scientific concepts of functional foods in Europe Consensus Document. *British J. of Nutr*. 1999;81:S1-S27.

233. Symmons DP. Epidemiology of rheumatoid arthritis: determinants of onset, persistence and outcome. *Best Pract Res Clin Rheumatol*. Dec 2002;16(5):707-722.
234. Monjardino T, Lucas R, Barros H. Frequency of rheumatic diseases in Portugal: a systematic review. *Acta Reumatol Port*. 2011 Oct-Dec 2011;36(4):336-363.
235. Branco J, Rodrigues A, Gouveia N, et al. Prevalence, physical and mental health patterns of rheumatic and musculoskeletal diseases in Portugal: results from a national survey. Paper presented at: 2015 ACR/ARHP Annual Meeting 2015; San Francisco.
236. Filipovic I, Walker D, Forster F, Curry A. Quantifying the economic burden of productivity loss in rheumatoid arthritis. *Rheumatology (Oxford)*. 2011;50(6):1083-1090.
237. Ibold Y, Frauenschuh S, Kaps C, Sittlinger M, Ringe J, Goetz PM. Development of a high-throughput screening assay based on the 3-dimensional pannus model for rheumatoid arthritis. *J Biomol Screen*. Oct 2007;12(7):956-965.
238. Abdulghani S, Caetano-Lopes J, Canhão H, Fonseca JE. Biomechanical effects of inflammatory diseases on bone-rheumatoid arthritis as a paradigm. *Autoimmun Rev*. Jul 2009;8(8):668-671.
239. Brennan FM, McInnes IB. Evidence that cytokines play a role in rheumatoid arthritis. *J Clin Invest*. Nov 2008;118(11):3537-3545.
240. McInnes IB, Schett G. The pathogenesis of rheumatoid arthritis. *N Engl J Med*. Dec 2011;365(23):2205-2219.
241. Cooles FA, Isaacs JD, Anderson AE. Treg cells in rheumatoid arthritis: an update. *Curr Rheumatol Rep*. Sep 2013;15(9):352.
242. Németh T, Mócsai A. The role of neutrophils in autoimmune diseases. *Immunol Lett*. Mar 2012;143(1):9-19.
243. Cascão R, Rosário HS, Souto-Carneiro MM, Fonseca JE. Neutrophils in rheumatoid arthritis: More than simple final effectors. *Autoimmun Rev*. Jun 2010;9(8):531-535.
244. Phillips DC, Dias HK, Kitas GD, Griffiths HR. Aberrant reactive oxygen and nitrogen species generation in rheumatoid arthritis (RA): causes and consequences for immune function, cell survival, and therapeutic intervention. *Antioxid Redox Signal*. Mar 2010;12(6):743-785.
245. Hodmdahl R. Inbred Mouse Models for Autoimmune Disease. In: Hedrich H, ed. *The Laboratory Mouse*. 1st ed. San Diego, California, USA London, UK: Elsevier Academic Press; 2004:261-268.
246. Cuzzocrea S, McDonald MC, Mota-Filipe H, et al. Beneficial effects of tempol, a membrane-permeable radical scavenger, in a rodent model of collagen-induced arthritis. *Arthritis Rheum*. Feb 2000;43(2):320-328.
247. Sophia Fox AJ, Bedi A, Rodeo SA. The basic science of articular cartilage: structure, composition, and function. *Sports Health*. Nov 2009;1(6):461-468.
248. Kiani C, Chen L, Wu YJ. Structure and function of aggrecan. *Cell Research*. 2002;2:19-32.
249. Trentham DE, Townes AS, Kang AH. Autoimmunity to type II collagen an experimental model of arthritis. *J Exp Med*. Sep 1977;146(3):857-868.
250. Trentham DE, Townes AS, Kang AH, David JR. Humoral and cellular sensitivity to collagen in type II collagen-induced arthritis in rats. *J Clin Invest*. Jan 1978;61(1):89-96.
251. Boivin D, Blanchette M, Barrette S, Moghrabi A, Béliveau R. Inhibition of cancer cell proliferation and suppression of TNF-induced activation of NFkappaB by edible berry juice. *Anticancer Res*. 2007 Mar-Apr 2007;27(2):937-948.

252. Bowen-Forbes CS, Zhang, Y., Nair M. Anthocyanin content, antioxidant, anti-inflammatory and anticancer properties of blackberry and raspberry fruits. *Journal of Food Composition and Analysis*. 2010;23:554–560.
253. Galvano F, La Fauci L, Vitaglione P, Fogliano V, Vanella L, Felgines C. Bioavailability, antioxidant and biological properties of the natural free-radical scavengers cyanidin and related glycosides. *Ann Ist Super Sanità*. 2007;43(4):382-393.
254. Lau FC, Josepha JA, McDonaldb JE, Kalt W. Attenuation of iNOS and COX2 by blueberry polyphenols is mediated through the suppression of NF- κ B activation *J. Functionnal Foods*. 2009;1:274-283.
255. Sangiovanni E, Vrhovsek U, Rossoni G, et al. Ellagitannins from Rubus berries for the control of gastric inflammation: in vitro and in vivo studies. *PLoS One*. 2013;8(8):e71762. .
256. Espín J, Larrosa M, García-Conesa M, Tomás-Barberán F. Biological significance of urolithins, the gut microbial ellagic Acid-derived metabolites: the evidence so far. *Evid Based Complement Alternat Med*. 2013;2013.
257. Santangelo C, Vari R, Scazzocchio B, Di Benedetto R, Filesi C, Masella R. Polyphenols, intracellular signalling and inflammation. *Ann Ist Super Sanità*. 2007;43(4):394 - 405.
258. Wu C-H, Wu C-F, Huang H-W, Jao Y-C, Yen G-C. Naturally occurring flavonoids attenuate high glucose-induced expression of proinflammatory cytokines in human monocyte THP-1-cells. *Mol. Nutr. Food Res*. 2009;53:964-995.
259. Mackenzie GG, Delfino JM, Keen CL, Fraga CG, Oteiza PI. Dimeric procyanidins are inhibitors of NF- κ B-DNA binding. *Biochem Pharmacol*. Nov 2009;78(9):1252-1262.
260. Spilmont M, Léotoing L, Davicco M-J, et al. Pomegranate and its derivatives can improve bone health through decreased inflammation and oxidative stress in an animal model of postmenopausal osteoporosis. *European Journal of Nutrition*. 2013;1-10.
261. E C, Sangiovanni E, M. Da. A review on the anti-inflammatory activity of pomegranate in the gastrointestinal tract. *Evid Based Complement Alternat Med*. 2013;2013(1-11).
262. Rice-Evans CA, Miller NJ, Paganga G. Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Radic Biol Med*. 1996;20(7):933-956.
263. Procházková D, Boušová I, Wilhelmová N. Antioxidant and prooxidant properties of flavonoids. *Fitoterapia*. Jun 2011;82(4):513-523.
264. O'Keefe J, Bell D. Postprandial hyperglycemia/hyperlipidemia (postprandial dysmetabolism) is a cardiovascular risk factor. *Am J Cardiol*. . 2007;100(5):899-904
265. Miglio C, Peluso I, Raguzzini A, et al. Antioxidant and inflammatory response following high-fat meal consumption in overweight subjects. . *Eur J Nutr*. . 2013;52(3):1107-1114.
266. Ellis C, Edirisinghe I, Kappagoda T, Burton-Freeman B. Attenuation of meal-induced inflammatory and thrombotic responses in overweight men and women after 6-week daily strawberry (*Fragaria*) intake. A randomized placebo-controlled trial. *J Atheroscler Thromb*. 2011;18(4):318-327.
267. Oostrom v, AJ, Sijmonsma, et al. Postprandial recruitment of neutrophils may contribute to endothelial dysfunction. *J Lipid Res*. 2003;44(3):576-583. .
268. van Oostrom A, Alipour A, Plokker T, Sniderman A, Cabezas M. The metabolic syndrome in relation to complement component 3 and postprandial lipo

- mia in patients from an outpatient lipid clinic and healthy volunteers. *Atherosclerosis*. 2007;190(1):167-173.
269. Salas-Salvadó J, Garcia-Arellano A, Estruch R, et al. Components of the Mediterranean-type food pattern and serum inflammatory markers among patients at high risk for cardiovascular disease. *Eur J Clin Nutr*. 2008;62(5):651-659.
270. Peluso I, Raguzzini A, Serafini M. Effect of flavonoids on circulating levels of TNF- α and IL-6 in humans: a systematic review and meta-analysis. *Mol Nutr Food Res*. 2013;57(5):784-801.
271. Cerdá B, Tomás-Barberán FA, Espin JC. Metabolism of Antioxidant and Chemopreventive Ellagitannins from Strawberries, Raspberries, Walnuts, and Oak-Aged Wine in Humans: Identification of Biomarkers and Individual Variability. *J Agric Food Chem*. 2005;53:227-235.
272. Espín JC, González-Barrio R, Cerdá B, López-Bote C, Rey AI, Tomás-Barberán FA. Iberian pig as a model to clarify obscure points in the bioavailability and metabolism of ellagitannins in humans. *J Agric Food Chem*. Dec 2007;55(25):10476-10485.
273. Crozier A, Del Rio D, Clifford MN. Bioavailability of dietary flavonoids and phenolic compounds. *Mol Aspects Med*. Dec 2010;31(6):446-467.
274. Lipińska L, Klewicka E, Sójka M. The structure, occurrence and biological activity of ellagitannins: a general review. *Acta Sci Pol Technol Aliment*. 2014;13(3):289-299.
275. Europeia C. Livro branco sobre uma estratégia para a Europa em matéria de problemas de saúde ligados à nutrição, ao excesso de peso e à obesidade {SEC(2007) 706} {SEC(2007) 707}. *COM/2007/0279 final* 2007:1-13.
276. Parlamento Europeu, Conselho. Rectificação ao Regulamento (CE) n.º 1924/2006 do Parlamento Europeu e do Conselho, de 20 de Dezembro de 2006, relativo às alegações nutricionais e de saúde sobre os alimentos (JO L 404 de 30.12.2006). *JO L 12 de 18.1.2007*, p. 3—18.
277. Verhagen H, Vos E, Franci S, Heinonen M, Loveren Hv. Status of nutrition and health claims in Europe. *Arch. Biochem. Biophys*. 2010;in press.
278. EFSA/NDA. General guidance for stakeholders on the evaluation of Article 13.1, 13.5 and 14 health claims. *EFSA Journal*. 2011;9(4)(2135): (acessível em www.europa.eu/efsajournal).
279. EFSA/NDA. Guidance on scientific requirements for health claims related to gut and immune function. *EFSA Journal*. 2011;9(4)(1984):acessível em: www.efsa.europa.eu/efsajournal.
280. GPP. Anuário Agrícola. Informação de Mercado. Yearbook of Agriculture. Market Information In: (DSE/GPP) DdSdE, ed. Lisboa 2012:457.
281. GPP/MAM. 2013. Anuário Agrícola. Informação de Mercado. Yearbook of Agriculture. Market Information In: (DSE/GPP) DdSde, ed. Lisboa 2014:371.
282. Seeram NP. Berry Fruits: Compositional Elements, Biochemical Activities, and the Impact of Their Intake on Human Health, Performance, and Disease. *J. Agric. Food Chem*. 2008:627 - 629.
283. Seeram NP. Emerging Research Supporting the Positive Effects of Berries on Human Health and Disease Prevention. *J. Agric. Food Chem*. 2012;60:685–5686.
284. Verde SC, Trigo MJ, Sousa MB, et al. Effects of gamma radiation on raspberries: safety and quality issues. *J Toxicol Environ Health A*. 2013;76(4-5):291-303.
285. Pinto P, Cardoso S, Pimpão RC, Tavares L, Ferreira RB, Santos CN. Daily polyphenol intake from fresh fruits in Portugal: contribution from berry fruits. *Int J Food Sci Nutr*. Dec 2013;64(8):1022-1029.

286. Pimpão RC, Dew T, Figueira ME, et al. Urinary metabolite profiling identifies novel colonic metabolites and conjugates of phenolics in healthy volunteers. *Mol Nutr Food Res*. Jul 2014;58(7):1414-1425.
287. OCDE. Guidance on Objective Tests to determine Quality of Fruits and Vegetables and Dry and Dried Produce. In: Development OfEC-0a, ed: OCDE; 2009:36.
288. Fojo CES. *Ocorrência de fluoretos em sumos, néctares e refrigerantes comercializados em Portugal Continental*. FF: Controlo da Qualidade e Toxicologia dos Alimentos, FFUL; 2011.
289. Anónimo. Frutos, produtos hortícolas e seus derivados. Determinação do teor de ácido ascórbico. Processos correntes. *NP 3030:1985 (Ed.1)*. 1995;IPQ, Caparica(Portugal).
290. Stamatakis G, Tsantila N, Samiotaki M, et al. Detection and isolation of antiatherogenic and antioxidant substances present in olive mill wastes by a novel filtration system. *J Agric Food Chem*. Nov 2009;57(22):10554-10564.
291. Singleton VL, Rossi JAJ. Colorimetry of total Phenolics with Phosphomolybdic-Phosphotungstic Acid Reagents. *Method Am. J. Enol. Vitic*. 1965;16(3):144-158.
292. Zhishen J, Mengcheng T, Jianming W. The determination of flavonoid contents in mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals. *Food Chemistry*. 1999;64:555-559.
293. Feliciano R, Meudt J, Shanmuganayagam D, Krueger C, Reed J. Ratio of "A-type" to "B-type" proanthocyanidin interflavan bonds affects extra-intestinal pathogenic *Escherichia coli* invasion of gut epithelial cells. *J Agric Food Chem*. 2014;62(18):3919-3925.
294. Huang D, Ou B, Hampsch-Woodill M, Flanagan JA, Prior RL. High-throughput assay of oxygen radical absorbance capacity (ORAC) using a multichannel liquid handling system coupled with a microplate fluorescence reader in 96-well format. *J Agric Food Chem*. Jul 2002;50(16):4437-4444.
295. Feliciano RP, Bravo MN, Pires MM, et al. Phenolic Content and Antioxidant Activity of Moscatel Dessert Wines from the Setúbal Region in Portugal. *Food Analytical Methods*. 2009;2(2): 149-161.
296. Ou B, Hampsch-Woodill M, Prior R. Development and validation of an improved oxygen radical absorbance capacity assay using fluorescein as the fluorescent probe. *J Agric Food Chem*. Oct 2001;49(10):4619-4626.
297. Serra AT, Matias AA, Frade RF, et al. Characterization of traditional and exotic apple varieties from Portugal. Part 2- Antioxidant and antiproliferative activities. *J Functional Food* 2010;2:46-53.
298. Salgado P, Melini V, Contrerasi D, Moreno Y, Mansilla HD. Fenton Reaction Driven By Iron Ligands. *J. Chil. Chem. Soc*. 2013;58(4):2096 - 2101.
299. Pimpão RC, Dew T, Oliveira PB, Williamson G, Ferreira RB, Santos CN. Analysis of phenolic compounds in Portuguese wild and commercial berries after multienzyme hydrolysis. *J Agric Food Chem*. May 2013;61(17):4053-4062.
300. Pimpão R, Ventura M, Ferreira R, Williamson G, Santos C. Phenolic sulfates as new and highly abundant metabolites in human plasma after ingestion of a mixed berry fruit purée. *Br J Nutr*. 2015;113(3):454-463.
301. Chen L, Xinb X, Zhang H, Yuana Q. Phytochemical properties and antioxidant capacities of commercial raspberry varieties *J of Functional Foods*. 2013;5:508-515.
302. González EM, de Ancos B, Cano MP. Preservation of raspberry fruits by freezing: physical, physico-chemical and sensory aspects *Eur Food Res Technol*. 2002;215:497-503.

303. De Michelis A. Parameters affecting pre-cooling, freezing, storage and transport of red raspberry fruits, individually frozen in discontinuous tunnels. Comparison among five varieties of *Rubus* sp. . *International Journal of Refrigeration*. 2003;26:586–592.
304. Krüger E, Dietrich H, Schöpplein E, Rasima S, Kürbelb P. Cultivar, storage conditions and ripening effects on physical and chemical qualities of red raspberry fruit *Postharvest Biology and Technology*. 2011;60:31–37.
305. Heyman L, Axling U, Blanco N, Sterner O, Holm C, Berge K. Evaluation of Beneficial Metabolic Effects of Berries in High-Fat Fed C57BL/6J Mice. *J Nutr Metab.* . 2014;2014:403041. .
306. Donno D, Beccaro G, Carlen C, et al. Analytical fingerprint and chemometrics as phytochemical composition control tools in food supplement analysis: characterization of raspberry bud-preparations of different cultivars. *J Sci Food Agric.* . 2015.
307. Delgado de la Torre M, Priego-Capote F, Luque de Castro M. Characterization and Comparison of Wine Lees by Liquid Chromatography-Mass Spectrometry in High-Resolution Mode. *J Agric Food Chem.* . 2015(Jan 22. [Epub ahead of print]).
308. Gouveia-Figueira S, Castilho P. Phenolic screening by HPLC–DAD–ESI/MSⁿ and antioxidant capacity of leaves, flowers and berries of *Rubus grandifolius* Lowe. *Industrial Crops and Products*. 2015;73(30):28-40.
309. Spínola V, Pinto J, Castilho P. Identification and quantification of phenolic compounds of selected fruits from Madeira Island by HPLC-DAD-ESI-MS(n) and screening for their antioxidant activity. *Food Chem.* . 2015;173:14-30.
310. McDougall GJ, Conner S, Pereira-Caro G, et al. Tracking (Poly)phenol components from raspberries in ileal fluid. *J Agric Food Chem.* Jul 2014;62(30):7631-7641.
311. Clifford M, Knight S, Kuhnert N. Discriminating between the Six Isomers of Dicafeoylquinic Acid by LC-MSⁿ. *J. Agric. Food Chem.* 2005;53(10):3821–3832.
312. Wu X, Prior RL. Systematic Identification and Characterization of Anthocyanins by HPLC-ESI-MS/MS in Common Foods in the United States: Fruits and Berries. *J. Agric. Food Chem.* 2005;53:2589-2599.
313. Oliveira J, Alinho da Silva M, Teixeira N, De Freitas V, Salas E. Screening of Anthocyanins and Anthocyanin-Derived Pigments in Red Wine Grape Pomace Using LC-DAD/MS and MALDI-TOF Techniques. *J Agric Food Chem.* . 2015;63(35):7636-7644.
314. EUBerry, 265942 F-K--. The sustainable improvement of European berry production, quality and nutritional value in a changing environment: Strawberries, Currants, Blackberries, Blueberries and Raspberries. In: Institute tJH, ed. *Fruit Quality Characterization and Determination. Work Package N°3.* www.euberry.univpm.it:1-97.
315. Bastos D, Saldanha L, Catharino R, et al. Phenolic antioxidants identified by ESI-MS from Yerba maté (*Ilex paraguariensis*) and green tea (*Cameliasinensis*) extracts. *Molecules*. 2007;12:423-432.
316. Aaby K, Wrolstad R, Ekeberg D, Skrede G. Polyphenol composition and antioxidant activity in strawberry purees; impact of achene level and storage. *J Agric Food Chem.* Jun 2007;55(13):5156-5166.
317. Mertz C, Cheynier V, Günata Z, Brat P. Analysis of phenolic compounds in two blackberry species (*Rubus glaucus* and *Rubus adenotrichus*) by high-performance liquid chromatography with diode array detection and electrospray ion trap mass spectrometry. *J Agric Food Chem.* 2007;55(21):8616-8624.

318. Plaza M, Kariuki J, Turner C. Quantification of individual phenolic compounds' contribution to antioxidant capacity in apple: a novel analytical tool based on liquid chromatography with diode array, electrochemical, and charged aerosol detection. *J Agric Food Chem.* . 2014;62(2):409-418.
319. Novak I, Janeiro P, Seruga M, Oliveira-Brett A. Ultrasound extracted flavonoids from four varieties of Portuguese red grape skins determined by reverse-phasehigh-performance liquid chromatography with electrochemical detection. *Anal Chim Acta.* 2008;230(2):107-115.
320. Manganaris G, Goulas V, Vicente A, Terry L. Berry antioxidants: small fruits providing large benefits. *J Sci Food Agric.* 2014;94(5):825-833.
321. WHO. Global action plan for the prevention and control of NCDs 2013-2020. *WHO Press.* 2013:55.
322. OECD. Health at a glance: Europe 2014. *OECD Publishing.* 2014:1-142.
323. Freitas M, a GP, G., b JLFCLa, Eduarda Fernandes. Isolation and activation of human neutrophils in vitro. The importance of the anticoagulant used during blood collection. *Clinical Biochemistry.* 2008(41):570-575.
324. Freitas M, Porto G, Lima JLFC, Fernandes E. Optimization of experimental settings for the analysis of human neutrophils oxidative burst in vitro *Talanta.* 2009(78):1476-1483.
325. Deprez S, Mila I, Huneau JF, Tome D, Scalbert A. Transport of proanthocyanidin dimer, trimer, and polymer across monolayers of human intestinal epithelial Caco-2 cells. *Antioxid Redox Signal.* Dec 2001;3(6):957-967.
326. Markopoulos C, Thoenen F, Preisig D, et al. Biorelevant media for transport experiments in the Caco-2 model to evaluate drug absorption in the fasted and the fed state and their usefulness. *Eur J Pharm Biopharm.* Apr 2014;86(3):438-448.
327. Domazou A, Zelenay V, Koppenol W, Gebicki J. Efficient depletion of ascorbate by amino acid and protein radicals under oxidative stress. *Free Radic Biol Med.* 2012;53(8):1565-1573.
328. Fukuzawa K. Dynamics of lipid peroxidation and antioxidion of alpha-tocopherol in membranes. *J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo).* Aug 2008;54(4):273-285.
329. Porter N. A perspective on free radical autoxidation: the physical organic chemistry of polyunsaturated fatty acid and sterol peroxidation. *J Org Chem.* . 2013;78(8):3511-3524.
330. Gebicki J, Nauser T, Domazou A, Steinmann D, Bounds P, Koppenol W. Reduction of protein radicals by GSH and ascorbate: potential biological significance. *Amino Acids.* 2010;39(5):1131 -1137.
331. Cheli F, Baldi A. Nutrition-based health: cell-based bioassays for food antioxidant activity evaluation. *J Food Sci.* 2011 Nov-Dec 2011;76(9):R197-205.
332. Denev P, Kratchanova M, Ciz M, et al. Antioxidant, antimicrobial and neutrophil-modulating activities of herb extracts. *Acta Biochim Pol.* 2014;61(2):359-367.
333. Bignotto L, Rocha J, Sepodes B, et al. Anti-inflammatory effect of lycopene on carrageenan-induced paw oedema and hepatic ischaemia-reperfusion in the rat. *Br J Nutr.* Jul 2009;102(1):126-133.
334. Silva S, Sepodes B, Rocha J, et al. Protective effects of hydroxytyrosol-supplemented refined olive oil in animal models of acute inflammation and rheumatoid arthritis. *J Nutr Biochem.* . 2015;S0955-2863(14):00261-00267.

335. Szabó C, Virág L, Cuzzocrea S, et al. Protection against peroxynitrite-induced fibroblast injury and arthritis development by inhibition of poly(ADP-ribose) synthase. *Proc Natl Acad Sci U S A*. Mar 1998;95(7):3867-3872.
336. Reagan-Shaw S, Nihal M, Ahmad N. Dose translation from animal to human studies revisited. *FASEB J*. Mar 2008;22(3):659-661.
337. Schiller J, Arnhold J, Arnold K. Action of hypochlorous acid on polymeric components of cartilage. Use of ¹³C NMR spectroscopy. *Z Naturforsch C*. 1995 Sep-Oct 1995;50(9-10):721-728.
338. Project EN. Musculoskeletal health status in Europe. Report v5.0. 2012 (http://eumusc.net/workpackages_wp4.cfm):1-191).
339. Laires P, Gouveia M, Canhão H, et al. Self-Reported Rheumatic Diseases and Early Retirement in Portugal. Paper presented at: ISOPOR20152015; Milan.
340. Faustino A. Epidemiologia e importância económica e social das doenças reumáticas: estudos nacionais. *Acta Reumatol Port*. 2002;27:21-26.
341. Laires P, Gouveia M, Canhão H, et al. Years of Working Life Lost Caused by Rheumatic Diseases in Portugal. Paper presented at: ISOPOR20152015; Milan.
342. Laires P, Gouveia M, Canhão H, et al. Cost of Early Retirement Caused by Rheumatic Diseases in Portugal. Paper presented at: ISOPOR20152015; Milan.
343. Laires P, Gouveia M, Branco J. O impacto económico das doenças reumáticas. *Observatório Nacional das Doenças Reumáticas*. 2012;capítulo 5:113- 140.
344. Cutolo M, Kitas G, vanRiel P. Burden of disease in treated rheumatoid arthritis patients: Going beyond the joint *Seminars in Arthritis and Rheumatism*. 2014;43:479–488.
345. Nordestgaard B, Benn M, Schnohr P, Tybjaerg-Hansen A. Nonfasting triglycerides and risk of myocardial infarction, ischemic heart disease, and death in men and women. *JAMA*. 2007;298(3):299-308.
346. Halkes C, van Dijk H, de Jaegere P, et al. Postprandial increase of complement component 3 in normolipidemic patients with coronary artery disease: effects of expanded-dose simvastatin. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. . 2001;21(9):1526-1530.
347. Norata G, Grigore L, Raselli S, et al. Post-prandial endothelial dysfunction in hypertriglyceridemic subjects: molecular mechanisms and gene expression studies. *Atherosclerosis*. . 2007;193(2):321-327. .
348. Anderson R, Evans M, Ellis G, et al. The relationships between post-prandial lipaemia, endothelial function and oxidative stress in healthy individuals and patients with type 2 diabetes. *Atherosclerosis*. . 2001;154(2):475-483.
349. Marsche G, Saemann M, Heinemann A, Holzer M. Inflammation alters HDL composition and function: implications for HDL-raising therapies. *Pharmacol Ther*. 2013;137(3):341-351.
350. Khera A, de la Llera-Moya M, Rodrigues A, et al. Cholesterol efflux capacity, high-density lipoprotein function, and atherosclerosis. *N Engl J Med*. . 2011;364(2):127-135.
351. Cai J, Pajak A, Li Y, et al. Total cholesterol and mortality in China, Poland, Russia, and the US. *Ann Epidemiol*. . 2004;14(6):399-408.
352. Sharrett A, Ballantyne C, Coady S, et al. Coronary heart disease prediction from lipoprotein cholesterol levels, triglycerides, lipoprotein(a), apolipoproteins A-I and B, and HDL density subfractions: The Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC) Study. . *Circulation*. . 2001;104(10):1108-1113. .

353. He F, Nowson C, Lucas M, MacGregor G. Increased consumption of fruit and vegetables is related to a reduced risk of coronary heart disease: meta-analysis of cohort studies. *J Hum Hypertens*. 2007;21(9):717-728. .
354. Cassidy A, Mukamal K, Liu L, Franz M, Eliassen A, Rimm E. High anthocyanin intake is associated with a reduced risk of myocardial infarction in young and middle-aged women. *Circulation*. . 2013;127(2):188-196.
355. McCullough M, Peterson J, Patel R, Jacques P, Shah R, Dwyer J. Flavonoid intake and cardiovascular disease mortality in a prospective cohort of US adults. *Am J Clin Nutr*. . 2012;95(2):454-464.
356. Qin Y, Xia M, Ma J, et al. Anthocyanin supplementation improves serum LDL- and HDL-cholesterol concentrations associated with the inhibition of cholesteryl ester transfer protein in dyslipidemic subjects. *Am J Clin Nutr*. 2009;90(3):485-492.
357. Zhu Y, Xia M, Yang Y, et al. Purified anthocyanin supplementation improves endothelial function via NO-cGMP activation in hypercholesterolemic individuals. . *Clin Chem*. . 2011;57(11):1524-1533.
358. Zhu Y, Ling W, Guo H, et al. Anti-inflammatory effect of purified dietary anthocyanin in adults with hypercholesterolemia: a randomized controlled trial. *Nutr Metab Cardiovasc Dis*. 2013;23(9):843-849.
359. Basu A, Fu D, Wilkinson M, et al. Strawberries decrease atherosclerotic markers in subjects with metabolic syndrome. *Nutr Res*. . 2010;30(7):462-469.
360. Kusano C, Ferrari B. Total antioxidant capacity: a biomarker in biomedical and nutritional studies. *J Cell Mol Biol*. . 2008;7(1):1-15.
361. Bloomer R, Ferebee D, Fisher-Wellman K, Quindry J, Schilling B. Postprandial oxidative stress: influence of sex and exercise training status. *Med Sci Sports Exerc*. . 2009;41(12):2111-2119.
362. Day A, Kemp H, Bolton C, Hartog M, Stansbie D. Effect of concentrated red grape juice consumption on serum antioxidant capacity and low-density lipoprotein oxidation. *Ann Nutr Metab*. . 1997;41(6).
363. Prior R, Gu L, Wu X, et al. Plasma antioxidant capacity changes following a meal as a measure of the ability of a food to alter in vivo antioxidant status. . *J Am Coll Nutr*. . 2007;26(2):170-181.
364. Gregersen S, Samocha-Bonet D, Heilbronn L, Campbell L. Inflammatory and oxidative stress responses to high-carbohydrate and high-fat meals in healthy humans. *J Nutr Metab*. . 2012;2012:238056.
365. Xie C, Kang J, Chen J, Nagarajan S, Badger T, Wu X. Phenolic acids are in vivo atheroprotective compounds appearing in the serum of rats after blueberry consumption. *J Agric Food Chem*. . 2011;59(18).
366. Jeong H, Hong S, Lee T, et al. Effects of black raspberry on lipid profiles and vascular endothelial function in patients with metabolic syndrome. *Phytother Res*. . 2014;28(10):1492-1498.
367. Bettencourt-Câmara M, Sepodes B, Bronze R, Figueira M. Supplements in the European Union: An Analysis of Health Claims Related to Articular Joint Health. *European Journal of Nutrition & Food Safety*. 2016;6(1):Disponível em <http://sciencedomain.org/issue/1355>.

368. Comissão. Regulamento (CE) n.º 353/2008 da Comissão, de 18 de Abril de 2008 , que estabelece normas de execução relativas aos pedidos de autorização de alegações de saúde, como previsto no artigo 15.º do Regulamento (CE) n.º 1924/2006 do Parlamento Europeu e do Conselho. *JO L 109 de*. 2008;19.4.2008:11-16.
369. EFSA Panel on Dietetic Products NaA. Draft general scientific guidance for stakeholders on health claim applications. *EFSA Journal*. 20YY;volume((issue): NNNN):1-29.
370. Aggett P, Antoine J-M, Asp N-G, et al. PASSCLAIM - process for the assessment of scientific suport for claims on foods. Consensus on criteria. *Eur J Nutr*. 2005;44(Suppl. 1):1-30.
371. Richardson DP. Preparing dossiers: strength of the evidence and problems of proof. *Proc Nutr Soc*. Feb 2012;71(1):127-140.
372. EFSA/NDA. Guidance on scientific requirements for health claims related to antioxidants, oxidative damage and cardiovascular health. *EFSA Journal*. 2011;2011;9(12)(2474):12 pp.(acessível em www.efsa.europa.eu/efsajournal).
373. Comissão. Regulamento (UE) nº 432/2012 de 16 de Maio de 2012 que estabelece uma lista de alegações de saúde permitidas relativas a alimentos que não referem uma redução de um risco de doença ou o desenvolvimento e a saúde das crianças (texto relevantes para efeitos de EEE). *JO L 136 de*. 2012(25.5.2012):1.

APÊNDICES E ANEXOS

APÊNDICE A - PROCEDIMENTOS DE OBTENÇÃO DOS EXTRATOS DE *RUBUS IDAEUS* L.

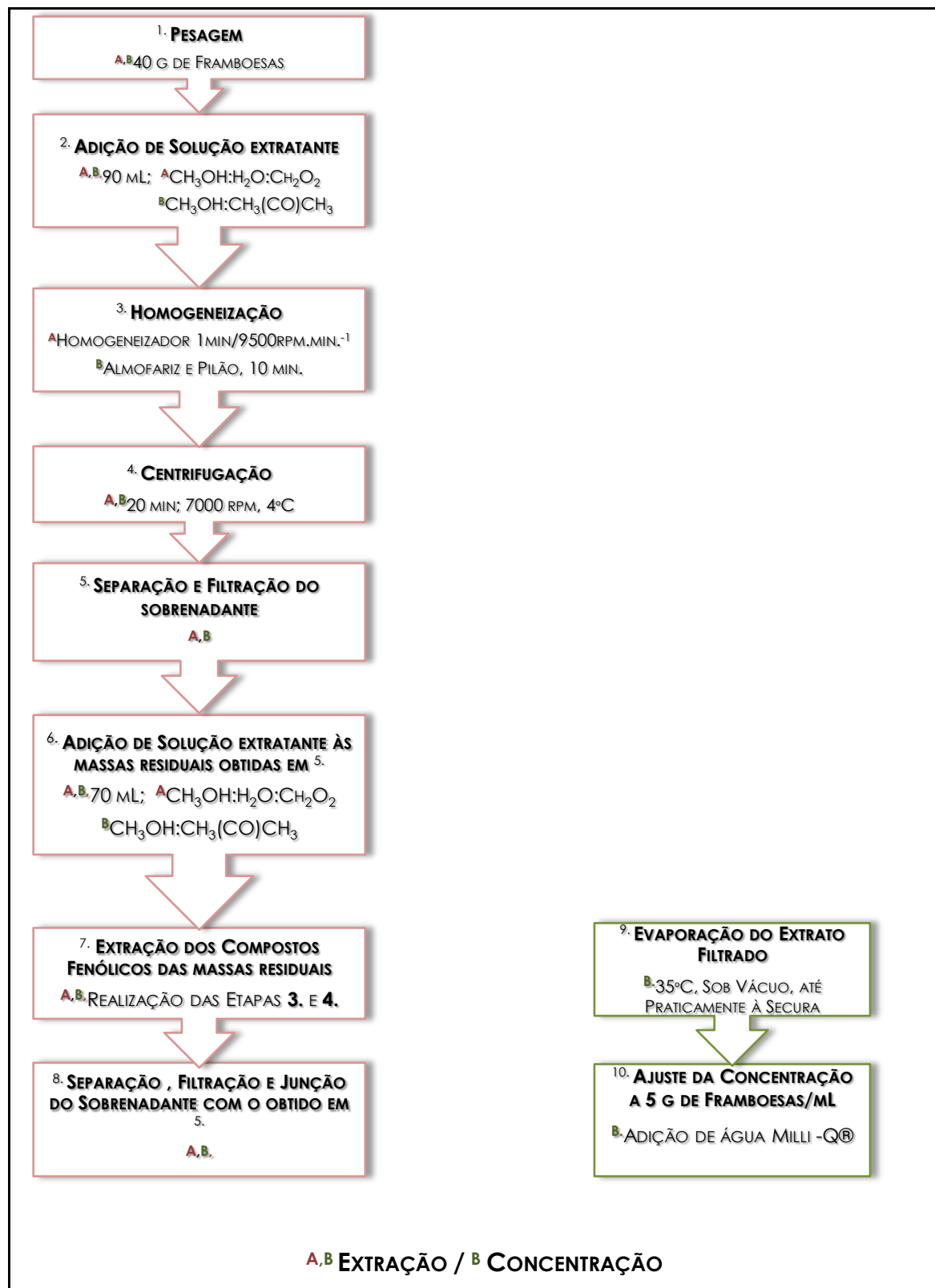


Figura 1 - Esquema dos procedimentos de obtenção dos extratos de *Rubus idaeus* L.: extrato acidificado de metanol e água (A) e extrato concentrado em água Milli-Q® de metanol e acetona (B).

**APÊNDICE B - CARACTERIZAÇÃO DE FRUTOS DE *RUBUS IDAEUS* L. DE QUATRO GENÓTIPOS EM TRÊS
OUTONOS CONSECUTIVOS (2011/2013)**

Tabela 1 – Aspetos da Composição Fenólica Global Média de Frutos de *Rubus idaeus* L. colhidos nos Outono de 2011, 2012 e 2013.

Parâmetro	FT, Folin	FLT	AT	THT	TCT
Ano/ Genótipo	(mg EAG/ 100 g FF)	(mg EC/ 100 g FF)	(mg EC3G/ 100 g FF)	(mg EAT/ 100 g FF)	(mg EC/ 100 g FF)
2011					
Himbo-top	246,5 ± 1,81	56,6 ± 0,29	26,2 ± 1,18	220,7 ± 9,54	20,8 ± 0,05
Amira	218,6 ± 1,63	48,9 ± 2,22	28,4 ± 0,47	210,0 ± 5,51	20,6 ± 0,07
Erika	180,6 ± 4,02	40,1 ± 1,35	12,6 ± 0,54	160,0 ± 2,08	20,6 ± 0,10
Polka	229,6 ± 3,50	53,8 ± 1,19	40,0 ± 1,51	237,4 ± 4,04	20,9 ± 0,08
2012					
Himbo-top	254,3 ± 4,91	52,9 ± 0,21	28,9 ± 1,25	263,4 ± 4,73	20,7 ± 0,06
Amira	252,0 ± 6,96	50,1 ± 2,06	27,8 ± 0,72	292,4 ± 2,08	20,6 ± 0,06
Erika	222,4 ± 4,89	43,8 ± 1,04	26,7 ± 1,18	243,7 ± 3,00	20,7 ± 0,04
Polka	219,4 ± 8,05	50,2 ± 2,13	33,9 ± 1,18	315,0 ± 5,69	20,7 ± 0,01
2013					
Himbo-top	352,0 ± 2,58	65,5 ± 1,45	79,1 ± 2,88	593,4 ± 1,29	20,5 ± 0,03
Amira	318,2 ± 7,49	61,5 ± 1,45	118,8 ± 2,05	620,1 ± 8,08	21,1 ± 0,03
Erika	302,7 ± 7,75	65,3 ± 0,61	93,1 ± 1,51	637,4 ± 1,40	21,0 ± 0,06
Polka	292,8 ± 8,82	59,1 ± 1,22	106,9 ± 4,64	579,4 ± 6,03	21,2 ± 0,07

* <LD; Cv. – Cultivar; FT – fenóis totais; FLT – flavonóides totais; AT – antocianinas totais; THT – taninos hidrolisáveis totais; TCT – taninos condensados totais. (n=3; Média± DP)

APÊNDICES E ANEXOS

Tabela 2 – Teor médio dos principais compostos fenólicos presentes nas framboesas produzidas nos Outono de 2011, 2012 e 2013².

Parâmetro	C3S	C3GR	C3G	C3R	AT	Sanguiina H-6	ET	AET	FT
Ano/Genótipo	(mg EC3G/ 100g FF)	(mg EC3G/ 100g FF)	(mg EC3G/ 100g FF)	(mg EC3G/ 100g FF)	(mg EC3G/ 100g FF)	(mg EAG/ 100 g FF)	(mg EAG/ 100 g FF)	(mg EAE/ 100 g FF)	(mg EAG/ 100 g FF)
2011									
Himbo-top	24,6 ± 3,32	13,7 ± 0,93	5,4 ± 0,64 ^a	1,8; <0,4 ^(LD)	49,4 ± 5,54	49,4 ± 5,54	33,3 ± 10,96	1,8;	119,1 ± 13,89
Amira	35,1 ± 1,23	<1,5 ^(LQ)	11,8 ± 1,73	<0,4 ^(LD)	47,7 ± 0,98	47,7 ± 0,98	44,7 ± 7,61	2,7;	123,1 ± 14,52
Erika	15,0 ± 1,76	5,2 ± 0,89	4,3 ± 0,84	1,6 ± 0,46 ^a	32,3 ± 10,34	32,3 ± 10,34	26,9 ± 5,41	1,6 ± 0,36	105,0 ± 38,36
Polka	53,4 ± 2,62	<0,4 ^(LD)	10,0 ± 7,72	<0,4 ^(LD)	63,5 ± 6,59	63,5 ± 6,59	38,1 ± 1,69	2,6 ± 0,47	119,1 ± 3,16
2012									
Himbo-top	36,5 ± 8,47	16,4 ± 2,87	6,1 ± 0,61	<0,4 ^(LD)	59,9 ± 8,87	59,9 ± 8,87	25,4 ± 5,42	2,6	99,6 ± 46,00
Amira	34,9 ± 2,24	4,7 ± 1,58	11,0 ± 1,23	<1,5 ^(LQ)	56,3 ± 1,68	56,3 ± 1,68	30,2 ± 4,89	2,2	97,4 ± 10,38
Erika	28,2 ± 0,47	10,2 ± 0,96	8,4 ± 0,43	<0,4 ^(LD)	53,7 ± 2,92	53,7 ± 2,92	31,4 ± 6,82	1,9 ± 0,32	121,4 ± 40,18
Polka	55,6 ± 5,33	<0,4 ^(LD)	15,3 ± 2,07	<0,4 ^(LD)	56,4 ± 5,70	56,4 ± 5,70	29,1 ± 1,51	1,8 ± 0,20	104,2 ± 14,45
2013									
Himbo-top	59,1 ± 1,81	19,4 ± 1,10	12,6 ± 1,60	6,8 ± 0,67	111,0 ± 6,24	111,0 ± 6,24	58,6 ± 5,57	2,1	160,4 ± 12,47
Amira	95,7 ± 2,68	<0,4 ^(LD)	42,8 ± 1,58	<0,4 ^(LD)	147,7 ± 5,71	147,7 ± 5,71	27,3 ± 0,51	2,5 ± 0,20	156,5 ± 3,14
Erika	72,6 ± 5,99	18,4 ± 2,52	32,1 ± 3,28	11,6 ± 0,84	138,3 ± 10,61	138,3 ± 10,61	48,1 ± 3,50	1,4	183,5 ± 15,10
Polka	94,1 ± 1,43	<0,4 ^(LD)	48,4 ± 1,58	<0,4 ^(LD)	148,3 ± 3,28	148,3 ± 3,28	36,2 ± 2,68	1,6 ± 0,08	172,8 ± 3,97

² Método de HPLC; AT – antocianinas totais; Cv. – Cultivar; C3S – cianidina-3-soforósido; C3GR- cianidina-3-glucosilrutinosido; C3G- cianidina-3-glucósido; C3R- cianidina-3-rutinosido; AET – ácido elágico total; ET – elagitaninos totais; FT- fenóis totais; LD – limite de detecção; LQ – limite de quantificação; Os dados apresentados são a média de 3 replicados e foram todos expressos numa base de peso fresco)

Apêndice c - Alegações de Saúde suscetíveis de serem usadas por frutos de *Rubus idaeus* L. na UE

Tabela 3 – Alegações nutricionais aplicáveis a framboesas frescas

Alegação Nutricional ²⁷⁶	Condições de uso
Alto teor em fibra	Se 100 g de framboesas fornecem pelo menos 6 g de fibras
Fonte de fibra	Se 100 g de framboesas fornecem pelo menos 3 g de fibras
Alto teor em vitamina C	Se 100 g de framboesas fornecem pelo menos 24 mg de vitamina C ¹
Fonte de vitamina C	Se 100 g de framboesas fornecem pelo menos 12 mg de vitamina C ²
Fonte de manganês	Se 100 g de framboesas fornecem pelo menos 0,3 mg de manganês ²
Fonte de vitamina B9	Se 100 g de framboesas fornecem pelo menos 30 µg de vitamina B9 ²

^{1,2}15 e 30%, respetivamente, do valor de referência do nutriente estabelecido na Parte A do Anexo XIII do Reg.1169/2011.

Tabela 4 – Alegações de saúde do Art.13.1 para um consumo de 100 g de framboesas frescas

CONSTITUINTE-ALVO	ALEGAÇÕES*
Vitamina C¹	<p>A vitamina C contribui para ...</p> <ul style="list-style-type: none"> - a manutenção do funcionamento do sistema imunológico normal durante e após um exercício físico intenso, - <u>o funcionamento normal do sistema imunológico</u>, - a formação normal do colagénio por assegurar o funcionamento normal dos ossos, - a formação normal do colagénio para assegurar o funcionamento normal das cartilagens, - a formação normal do colagénio para assegurar o funcionamento normal das gengivas, - a formação normal do colagénio para assegurar o funcionamento normal da pele, - a formação normal do colagénio para assegurar o funcionamento normal dos dentes, - um metabolismo energético normal, - o funcionamento normal do sistema nervoso, - funções psicológicas normais, - a regeneração da forma reduzida da vitamina E. <p>A vitamina C aumenta a absorção de ferro</p>
Manganês¹	<p>O manganês contribui para ...</p> <ul style="list-style-type: none"> - um metabolismo energético normal, - a manutenção de uma ossatura normal, - a formação normal de tecidos conjuntivos, - a <u>proteção das células contra o stresse oxidativo</u>.
Folatos¹	<p>Os folatos contribuem para ...</p> <ul style="list-style-type: none"> - o <u>funcionamento normal do sistema imunológico</u>, - o crescimento dos tecidos maternos durante a gravidez, - a síntese normal de aminoácidos, - a formação normal do sangue, - o metabolismo normal da homocisteína, - funções psicológicas normais, - a redução da fadiga.

* Segundo o estabelecido no Reg. 432/2012 e atos modificativos³⁷³; ¹quando a framboesa tem uma alegação nutricional

APÊNDICES E ANEXOS

ANEXO A - PARÂMETROS DE CALIBRAÇÃO USADOS NA QUANTIFICAÇÃO DE COMPOSTOS SEPARADOS POR HPLC

Tabela 5. Parâmetros de calibração usados na quantificação dos compostos fenólicos separados por HPLC-DAD-ED

PADRÃO	RETA DE CALIBRAÇÃO	R²	GAMA DA CALIBRAÇÃO (ppm)	LD (ppm)	LQ (ppm)	c.d.o. (nm)
Ácido Elágico*	$y = 43499x + 196401$	0,9815	5 - 100	-	-	360
Ácido Elágico	$y = 184966x + 11301$	0,9993	0,5 - 50	0,15	0,50	360
Ácido Ferúlico	$y = 383469x + 255778$	0,9991	0,3 - 100	0,10	0,30	320
Ácido Gálgico*	$y = 309355x - 108904$	0,9983	5 - 100	-	-	280
Ácido Gálgico	$y = 194165x + 3274,3$	0,9998	0,5 - 25	0,10	0,50	280
Ácido <i>p</i> -coumárico	$y = 518525x + 272556$	0,9982	0,3 - 50	0,08	0,30	320
Catequina	$y = 54631x + 12142$	0,9997	2 - 80	0,5	2,00	360
Cianidina-3-glucósido*	$y = 229259x + 82760$	0,9998	5 - 100	-	-	520
Cianidina-3-glucósido	$y = 182931x + 72811$	0,9983	15 - 50	0,4	1,5	520
Cianidina-3-glucósido	$y = 113547x + 69971$	0,9962	4 - 32	1	4	520
Cianidina-3-rutinósido	$y = 157070x + 58541$	0,9998	2 - 25	0,4	2,0	520
Quercetina	$y = 256132x - 28762$	0,9998	0,6 - 100	0,1	0,6	360
Rutina	$y = 168527x + 83237$	0,9995	0,5 - 50	0,2	0,5	360
Trolox	$y = 11,296x + 9,5882$	0,9952	2,5 - 200	1,0	2,5	ED

*parâmetros de calibração usados para a quantificação dos compostos das amostras de 2010

ANEXO B – ENIH: QUESTIONÁRIO MÉDICO

A ser completado por cada potencial voluntário e validado pelo seu médico assistente:

Nome:	
Idade:	
Sexo:	
Altura:	
Peso:	
Contacto (número de telefone ou e-mail):	

1* Considera-se uma pessoa saudável?

Sim	Não
-----	-----

2* Está a tomar alguma medicação?

Sim	Não
-----	-----

Se sim, indique que medicação está a tomar: _____

3* Já efetuou alguma cirurgia?

Sim	Não
-----	-----

Se sim, indique qual: _____

4* Tem algum antecedente de doenças metabólicas?

Sim	Não
-----	-----

5* Tem algum historial de alergia e/ou intolerância?

Sim	Não
-----	-----

Se sim, por favor indique qual o tipo: _____

6* Pratica alguma actividade física?

Sim	Não
-----	-----

Se sim, por favor indique qual e o número de horas por semana com que o faz

7* É fumador?

Sim	Não
-----	-----

8* Há alguma razão pela qual se considera inapto para participar neste estudo?

Sim	Não
-----	-----

_____ Nome do participante	_____ Data	_____ Assinatura
_____ Nome do médico	_____ Data	_____ Assinatura
_____ Investigador encarregado	_____ Data	_____ Assinatura

ANEXO C - ENIH: FORMULÁRIO DO CONSENTIMENTO INFORMADO DO PARTICIPANTE

Título do estudo: “*Papel Protetor da Framboesa na Hiperglicemia, Hipertrigliceridemia, Stress Oxidativo e Inflamação Pós Prandiais*”

Nome dos investigadores: Doutoras M^a Eduardo Figueira e M^a Rosário Bronze

S/N

1* Eu confirmo que li e entendi o folheto informativo explicando o projeto de investigação em causa e tive a oportunidade de realizar questões acerca do projeto.

☐

2* Eu compreendo que a minha participação é voluntária e que sou livre de me retirar do estudo a qualquer momento sem necessitar de dar justificações e sem quaisquer consequências negativas. Para além do mais, se não quiser responder a qualquer questão sou livre de recusar.

☐

3* Eu compreendo que as minhas respostas serão mantidas estritamente confidenciais. Dou a minha permissão para que os membros da equipa de investigação tenham acesso às minhas respostas anónimas. Eu compreendo que o meu nome não estará ligado com a investigação em causa e não serei identificado ou identificável nos relatórios resultantes da investigação.

☐

4* Eu aceito que os dados recolhidos de mim sejam utilizados em futuras Investigações.

☐

5* Eu aceito fazer parte do projeto de investigação mencionado.

☐

Nome do voluntário

Data

Assinatura

Investigador responsável

Data

Assinatura

ANEXO D - ENIH: INSTRUÇÕES PARA OS PARTICIPANTES

Alimentos a evitar (2 dias antes do estudo):

- Frutos
- Alimentos contendo frutos
- Vegetais
- Alimentos contendo vegetais
- Cerveja
- Vinho
- Sumos
- Azeite
- Especiarias (Salsa, coentros, hortelã, pimenta, canela, etc.)
- Café
- Geleias ou compotas de frutos e vegetais
- Chás ou infusões
- Chocolate

APÊNDICES E ANEXOS

ANEXO E - ENIH: QUESTIONÁRIO PRÉ-ESTUDO

A ser completado individualmente por cada voluntário:

Código do voluntário:	
Data e hora	

1* Ingeriu frutos ou alimentos contendo frutos nos últimos 2 dias?

Sim	Não
-----	-----

2* Ingeriu alguns vegetais ou outros alimentos presentes na lista “A evitar” nos últimos dois dias?

Sim	Não
-----	-----

Se sim, detalhe quais e em que quantidades:

3*Tomou alguma medicação fora da rotina ou não indicadas no questionário médico efetuado?

Sim	Não
-----	-----

Se sim, por favor detalhe o quê e em que quantidade:
